

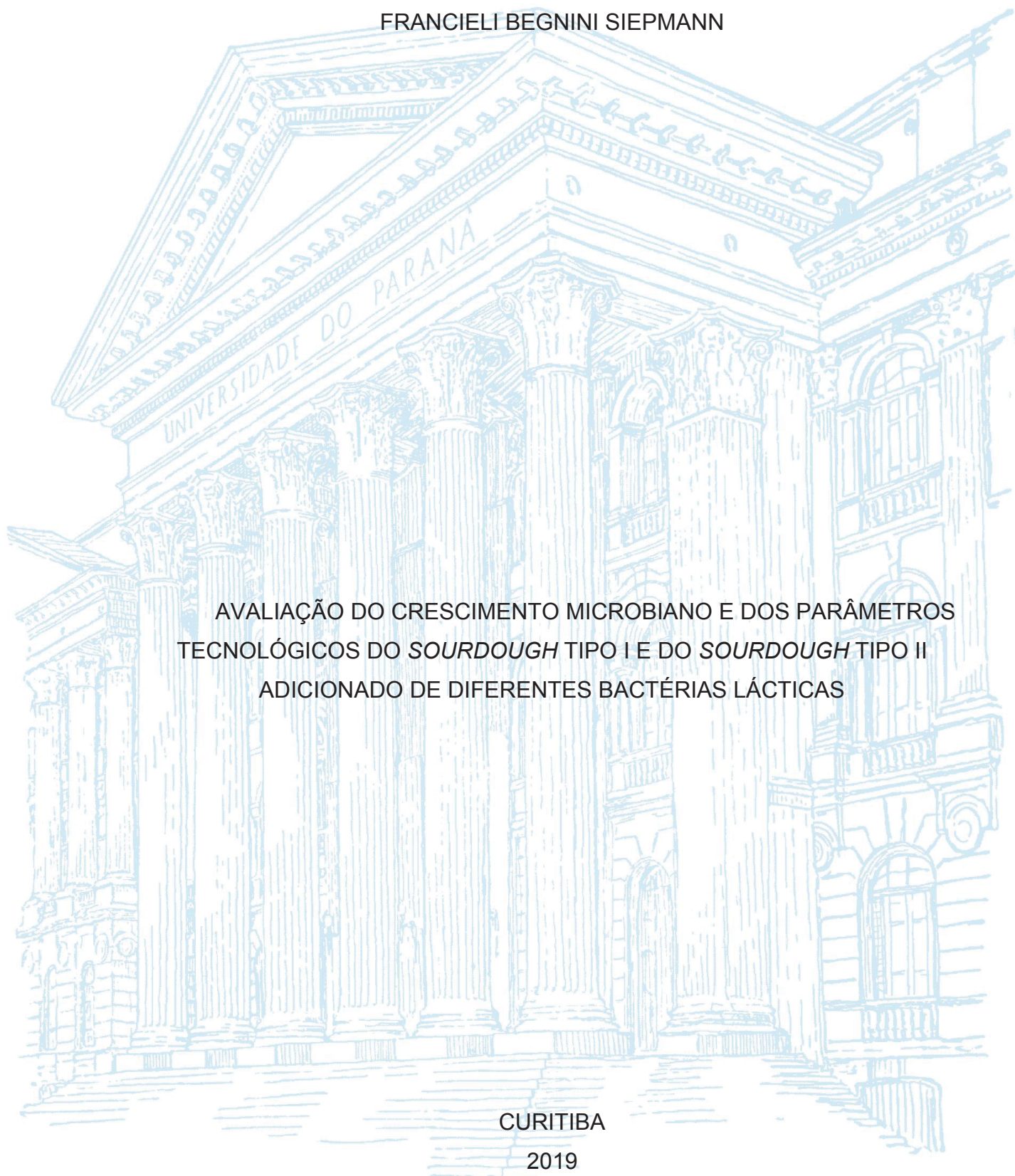
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELI BEGNINI SIEPMANN

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO E DOS PARÂMETROS  
TECNOLÓGICOS DO  *SOURDOUGH* TIPO I E DO  *SOURDOUGH* TIPO II  
ADICIONADO DE DIFERENTES BACTÉRIAS LÁCTICAS

CURITIBA

2019



FRANCIELI BEGNINI SIEPMANN

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO E DOS PARÂMETROS  
TECNOLÓGICOS DO *SOURDOUGH* TIPO I E DO *SOURDOUGH* TIPO II  
ADICIONADO DE DIFERENTES BACTÉRIAS LÁCTICAS

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Michele Rigon Spier  
Co-orientador(a): Prof(a). Dr(a). Nina Waszczynskyj

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR  
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S572a

Siepmann, Francieli Begnin

Avaliação do crescimento microbiano e dos parâmetros tecnológicos do sourdough tipo I e do sourdough tipo II adicionado de diferentes bactérias lácticas [recurso eletrônico] / Francieli Begnin Siepmann. – Curitiba, 2019.

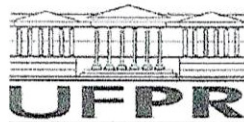
Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2019.

Orientador: Michele Rigon Spier – Coorientador: Nina Waszczynskyj.

1. Copostos orgânicos voláteis. 2. Crescimento microbiano. 3. Fermentação. 4. Lactobacillus. I. Universidade Federal do Paraná. II. Spier, Michele Rigon. III. Waszczynskyj, Nina. IV. Título.

CDD: 363.7392

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS - 40001016019P6

### TERMO DE APROVAÇÃO

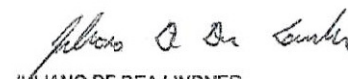
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FRANCIELI BEGNINI SIEPMANN** intitulada: **AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO E DOS PARÂMETROS TECNOLÓGICOS DO SOURDOUGH TIPO I E DO SOURDOUGH TIPO II ADICIONADO DE DIFERENTES BACTÉRIAS LÁCTICAS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 26 de Abril de 2019.

  
MICHELE RIGON SPIER  
Presidente da Banca Examinadora

  
ROSEMARY HOFFMANN RIBANI  
Avaliador Interno (UFPR)

  
JULIANO DE DEA LINDNER  
Avaliador Externo (UFSC)

  
IVO MOTTIN DEMIATE  
Avaliador Externo (UEPG)

  
GILBERTO VINICIUS DE MELO PEREIRA  
Avaliador Externo (UFPR)

*Dedico este trabalho à Deus, que é meu sustento, ao  
meu amado marido Davi Daniel Siepmann por  
todo seu companheirismo e força e minha adorada  
família pelo incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus pela oportunidade de ter realizado este trabalho, pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho, por toda a força, sustento e conhecimento que me permitiu obter durante esta jornada.

Ao meu marido à quem sou eternamente grata por seu companheirismo e sua dedicação, que nunca mediu esforços para me ajudar a realizar esse sonho. Por seu amor que muda o meu olhar sobre o mundo. Pelo seu incentivo que me faz acreditar em mim mesma e me leva a caminho que nunca imaginei estar.

À minha família, que me incentivou a correr atrás dos meus sonhos, que mesmo a distância sempre procurou me dar forças com palavras, conselhos e orações, amo a cada um e sou imensamente feliz pela vida de cada um.

Agradeço as professoras Michele Rigon Spier e Nina Waszczyński por todo conhecimento repassado, pela confiança na realização deste projeto, por todo o incentivo, suporte e crescimento durante a caminhada, muito obrigada.

À Universidade Federal do Paraná (UFPR), em especial ao PPGEAL pela oportunidade de realizar este trabalho. A professora Maria Lucia Masson pela disponibilidade de espaço para realização das análises e à prof. Rosemary Hoffmann Ribani pela utilização do UPLC.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida.

Aos professores Bruno José Gonçalves Da Silva, Patricio Guillermo Peralta Zamora, Luiz Pereira Ramos e ao técnico Thiago do departamento de Química pela disponibilidade e pelo uso dos equipamentos, cromatógrafo gasoso, o espectrômetro FT-IR e cromatógrafo líquido de alta eficiência.

À Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (CBAS) – Rio de Janeiro (RJ) pela identificação das cepas.

Ao professor Michael Gaenzle pela oportunidade e confiança em me deixar trabalhar em seu laboratório e por todo conhecimento repassado.

As minhas queridas amigas do LENGEBIO, Cristina Maria Zanette, Luana Paludo, Suélen Frantz e Tatiane A. Gomes por todos os conselhos, ajuda, e pelos momentos de descontração, muito obrigada e que nossa amizade dure para muito além do doutorado mesmo a distância.

À Beatriz Sousa de Almeida pela dedicação na realização deste projeto e pela sua amizade, obrigada de coração.



Aos alunos Lucas, Fernanda, Alessandra, Polyana, Ana Gabriela, pelas trocas de experiências e pelos momentos de descontração.

As minhas amigas Luciane, Andreia e Kelly, e ao grupo de mulheres da Calvary que me ajudaram, aconselharam e oraram por mim durante todo esse período.

A todos que não estão citados aqui mas que contribuíram de alguma forma para a realização e conclusão deste trabalho.

Um trabalho só pode ser realizado com a união de pessoas e pensamentos por isso agradeço imensamente a cada um pela conclusão desta etapa.

**Muito Obrigada!**

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar,  
divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais  
bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua  
misterioso diante de meus olhos.” (Isaac Newton)*



## RESUMO

O *sourdough* é uma massa farinácea ácida fermentada por bactérias ácido láctico (BAL) com ou sem a adição de leveduras, podendo ser classificada em quatro tipos. No tipo I a fermentação ocorre por vários dias e é iniciada pela microbiota presente na farinha. No tipo II devido a adição de inóculos e/ou culturas iniciadoras a fermentação é de no máximo 24h e a partir da desidratação desta massa se obtém o *sourdough* tipo III. O tipo IV ou *sourdough* mix é uma massa fermentada por vários dias mas com a adição de inóculo. A adição do *sourdough* aumenta a acidez, concentração de aromas, elasticidade e o *shelf-life* dos pães, além de reduzir a concentração de fatores antinutricionais, como os fitatos, e por isso vem sendo amplamente estudado nos últimos anos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi estudar as alterações bioquímicas e a produção de compostos voláteis, a fim de identificar o tempo ótimo para a fermentação do *sourdough* tipo I. Além disso, foi realizado um *screening* para a seleção de uma cultura iniciadora ideal para a produção de um *sourdough* tipo II com qualidades tecnológicas desejáveis (maior acidez, elasticidade e volume) e com perfil aromático. Como complemento foi avaliado o efeito da adição do *sourdough* II fermentado com a cepa *Lactobacillus reuteri* produtora e não de reutericiclina na redução do *rope spoilage* em pães. Nos resultados identificou-se que as principais modificações no glúten e no amido, assim como a estabilização do crescimento microbiano e a formação de voláteis no *sourdough* tipo I ocorreram com 5 dias, sendo, portanto, o tempo ideal de fermentação desta massa. Já, no *sourdough* tipo II fermentado por 1 BAL isoladamente verificou-se a produção de massas com alta acidez e apenas a *L. reuteri* alcançou o valor de Quociente de Fermentação ideal (2,46). Com relação aos compostos voláteis, *Lactobacillus sakei* apresentou formação de ácido butanoico (composto indesejado). Já *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus amilovor*, *L. reuteri* e *Pediococcus pentosaceus* mostraram características aromáticas desejáveis. Ao avaliar a adição em co-cultivo da *L. amilovor*, *L. brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *L. reuteri* e *Pediococcus pentosaceus* a 28 e 35 °C, observou-se por meio da Análise de Componentes Principais que a temperatura foi responsável por mais de 40% das diferenças entre as massas. Além disso, a adição do *sourdough* na produção de pães resultou no aumento da concentração de compostos voláteis com aromas de flores e frutas e também a dureza do miolo, a qual teve forte correlação negativa com o pH. Contudo, com a adição da *L. brevis* e *L. plantarum* a 35 °C, o pão apresentou boa acidez, dureza estatisticamente semelhante ao controle, e com melhor perfil aromático devido a predominância de compostos com aromas frutados. A adição do *sourdough* em pães também apresentou efeito positivo na redução do *rope spoilage*, sendo que com 24% de *sourdough* não foi identificada nenhuma característica desta degradação durante os sete dias de avaliação. Com a adição de 12% de *sourdough* com reutericiclina foi possível aumentar em mais dois dias o *shelf-life* do pão.

Palavras-chave: Compostos voláteis. FT-IR. *Rope spoilage*.

## ABSTRACT

Sourdough is an acid dough fermented by lactic acid bacteria (BAL) with or not yeasts addition, which can be classified into four types. In type I, the fermentation occurs for some days and is initiated by the microbiota present in the flour. In type II due to inoculum and / or starter cultures addition, the fermentation is of maximum 24 h. From the dehydration of this dough, the sourdough type III is obtained. Type IV or sourdough mix is a fermented dough for some days but with inoculum addition. The sourdough addition increases the acidity, aroma concentration, elasticity and shelf-life of breads, as well as reducing the concentration of antinutritional factors, such as phytates, and for these, has been extensively studied in recent years. In this way, the objective of this work was to study the biochemical changes and the volatile compounds production in order to identify the optimum time for the sourdough type I fermentation. In addition, a screening was performed for the selection of an ideal starter culture for sourdough type II production with good technological qualities and aromatic profile. As a complement, we evaluated the effect of adding sourdough II fermented with *Lactobacillus reuteri* (producer and not of reutericyclin) in reducing the rope spoilage in breads. In the results it was identified that the main modifications in gluten and starch, as well as the stabilization of microbial growth and the formation of volatiles in type I sourdough occurred with 5 days, being, therefore, the ideal time of fermentation of this dough. Already, in type II sourdough fermented by 1 BAL alone the doughs showed high acidity. *L. reuteri* was the only one reached the ideal fermentation quotient value (2.46). Regarding the volatile compounds, *Lactobacillus sakei* showed formation of butanoic acid (unwanted compound). *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus amilovor*, *L. reuteri* and *Pediococcus pentosaceus* showed desirable aromatic characteristics. Evaluating the fermentation in co-cultivation of *L. amilovor*, *L. brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *L. reuteri* and *Pediococcus pentosaceus* at 28 and 35 ° C, observed by Principal Component Analysis that the temperature was responsible for more than 40% of the differences between the doughs. In breads, the sourdough addition increased the volatile compounds concentration with flower and fruit aromas. The crumb hardness increased too, which had a strong negative correlation with pH. However, with the addition of *L. brevis* and *L. plantarum* at 35 ° C, the bread presented good acidity, hardness statistically similar to the control, and with a better aromatic profile due to the predominance of compounds with fruity aromas. In addition, it was found that the increase in sourdough concentration reduced rope spoilage in bread. With 24% none characteristic of this degradation were identified during the seven days of evaluation. Addition of 12% sourdough with the reutericyclin made possible the increase in two days of bread shelf-life.

Key-words: Volatile compounds. FT-IR. *Rope spoilage*.

## LISTA DE FÍGURAS

### Artigo I

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA APRESENTANDO OS MÉTODOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DO SOURDOUGH, CONTENDO AS ETAPAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO E AS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO E PRODUTOS FINAIS PRODUZIDOS COM CADA TIPO DE <i>SOURDOUGH</i> .....	27
FIGURA 2 – PRINCIPAIS ALTERAÇÕES QUE OCORREM NA MASSA E QUE INFLUENCIAM DIRETAMENTE NA TEXTURA, PRESENÇA DE AROMAS E NO AUMENTO DO <i>SHELF-LIFE</i> .....	45

### Artigo II

FIGURA 1 - AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E TECNOLÓGICA DO <i>SOURDOUGH</i> BRASILEIRO DURANTE 9 DIAS DE FERMENTAÇÃO .....	71
FIGURA 2 - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DA FERMENTAÇÃO DO <i>SOURDOUGH</i> .....	79
FIGURA 3 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DE 0, 1, 3, 5, 7 E 9 DIAS DE FERMENTAÇÃO DO <i>SOURDOUGH</i> .....	80
FIGURA 4 - MICROGRAFIAS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DO <i>SOURDOUGH</i> .....	82

### Artigo III

FIGURA 1 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS E LEVEDURA EM MASSA TIPO II DURANTE 24H DE FERMENTAÇÃO .....	92
---	----

### Artigo IV

FIGURA 1 – PERCENTUAL DE ÁREA DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS, AGRUPADOS NAS PRINCIPAIS CLASSES QUÍMICAS DE <i>SOURDOUGHS</i> TIPO II .....	121
FIGURA 2 – ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DOS PARÂMETROS TECNOLÓGICOS E DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DOS <i>SOURDOUGHS</i> TIPO II.....	122

FIGURA 3 – COMPOSTOS VOLÁTEIS IDENTIFICADOS NOS SOURDOUGHS E NOS PÃES ANTES E APÓS O PROCESSO DE ASSAMENTO, AGRUPADOS NOS PRINCIPAIS GRUPOS QUÍMICOS .....	125
--	-----

## Artigo V

FIGURA 1 – REDUÇÃO NA CONTAGEM DE ESPOROS DURANTE O PROCESSO DE ASSAMENTO DE PÃES CONTAMINADOS COM <i>Bacillus</i> COM DIFERENTES QUANTIDADE DO <i>OPERON spoVA<sup>2mob</sup></i> .....	135
FIGURA 2 – EVOLUÇÃO DO <i>ROPE SPOILAGE</i> EM PÃES CONTAMINADOS COM <i>Bacillus</i> COM DIFERENTES QUANTIDADES DO <i>OPERON spoVA<sup>2MOB</sup></i> .....	137
FIGURA 3 – FORMAÇÃO DE LIGA/FIOS DURANTE A DEGRADAÇÃO POR <i>ROPE SPOILAGE</i> POR <i>Bacillus</i> .....	139
FIGURA 4 – REDUÇÃO NA CONTAGEM DE ESPOROS DURANTE O PROCESSO DE ASSAMENTO DE PÃES CONTAMINADOS COM <i>Bacillus amiloliquefaciens</i> 2004 E ADICIONADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE <i>SOURDOUGH</i> ...	140
FIGURA 5 – EFEITO DA ADIÇÃO DO <i>SOURDOUGH</i> NO DESENVOLVIMENTO DO <i>ROPE SPOILAGE</i> POR <i>Bacillus amiloliquefaciens</i> 2004.....	142

## LISTA DE TABELAS

### Artigo I

TABELA 1 – COMPILAÇÃO NÃO EXAUSTATIVA DAS BACTÉRIAS HETEROFERMENTATIVAS, HETEROFERMENTATIVAS FACULTATIVAS E B=HOMOFERMENTATIVAS E LEVEDURAS ISOLADAS EM <i>SOURDOUGHS</i> PRODUZIDOS COM DIFERENTES FARINHAS.....	33
TABELA 2 – PRINCIPAIS COMPOSTOS VOLÁTEIS ENCONTRADOS EM <i>SOURDOUGH</i> TIPO II E PÃES, COM COM SUAS RESPECTIVAS CARACTERÍSTICAS DE ODOR.....	45
TABELA 3 – <i>SOURDOUGHS</i> TIPO III COMERCIALIZADOS EM DIFERENTES PAÍSES.....	58

### Artigo II

TABELA 1 – CONDIÇÃO UTILIZADA NA IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO <i>HEAD-SPACE</i> ) CG-HS-SPME.....	67
TABELA 2 – PERFIL DE VOLÁTEIS (ÁREA PERCENTUAL), DISTRIBUÍDOS DE ACORDO COM A CLASSE QUÍMICA, EM <i>SOURDOUGH</i> DE FARINHA DE TRIGO INTEGRAL AO LONGO DA FERMENTAÇÃO DE NOVE DIAS COM COM SUAS RESPECTIVAS CARACTERÍSTICAS DE ODOR.....	72

### Artigo III

TABELA 1 – RESULTADOS DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E TECNOLÓGICOS OBTIDOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DO <i>SOURDOUGH</i> TIPO II A 35 °C.....	92
TABELA 2 – PERFIL VOLÁTIL DO <i>SOURDOUGH</i> TIPO II DE TRIGO INTEGRAL FERMENTADO POR ONZE BACTÉRIAS LÁCTICAS A 35 °C DURANTE 24h.....	99

#### Artigo IV

TABELA 1 – CULTURAS INICIADORAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE <i>SOURDOUGH</i> DE TRIGO INTEGRAL TIPO II FERMENTADOS DURANTE 24h A 28 E 35 ° C.....	110
TABELA 2 – RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DOS <i>SOURDOUGHS</i> DE TRIGO INTEGRAL TIPO II FERMENTADOS DURANTE 24h A 28 E 35 °C.....	115
TABELA 3 - ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA E EVOLUÇÃO DO pH DE PÃO BRANCO COM E SEM ADIÇÃO DO <i>SOURDOUGH</i> .....	121

#### Artigo V

TABELA 1 – DIA DE INÍCIO DE CADA CARACTERÍSTICA DO <i>ROPE SPOILAGE</i> NOS PÃES CONTAMINADOS COM <i>Bacillus</i> (COM DIFERENTES QUANTIDADES DO <i>OPERON spoVA<sup>2mob</sup></i> ) ARMAZENADOS A 30 °C E <i>aw</i> DE 0,95.....	134
TABELA 2 – INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE <i>SOURDOUGH</i> FERMENTADO COM <i>Lactobacillus reuteri</i> NO APARECIMENTO DO <i>ROPE SPOILAGE</i> (DIAS) EM PÃES CONTAMINADOS COM <i>Bacillus amiloliquefaciens</i> 2004 E ARMAZENADOS A 30 °C E <i>AW</i> DE 0,95.....	139
TABELA 3 – EFEITO DA REUTERICICLINA NA PREVENÇÃO DO <i>ROPE SPOILAGE</i> EM PÃES CONTAMINADOS COM <i>Bacillus amiloliquefaciens</i> 2004 E ARMAZENADOS A 30 °C E <i>aw</i> DE 0,95.....	141

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI	- Amostra do Isolamento
ALBm	- Ágar Luria- Bertani modificado
ANOVA	- Análise de variância
ATCC	- American Type Culture Collections
BAL	- Bactérias do ácido láctico
CAR/PDMS	- Fibra Carboxen/Polydimethylsiloxane
CONAB	- Companhia Nacional de Abastecimento
DRBC	- Meio Dicloran Rosa Bengala
DRIFTS	- Transformada De Fourier De Infravermelho Por Refletância Difusa
Far	- Farinha
FIOCRUZ	- Fundação Oswaldo Cruz
HPLC	- High Performance Liquid Chromatography
HS-SPME	- Cromatografia Gasosa Acoplada A Espectrometria De Massa
IR	- Índice De Refração
LB	- Meio Luria- Bertani
LS	- Grânulos Lenticulares De Amido
MALDI-TOF	- Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight
MRS	- Meio Man Rogosa e Sharpe
MRSm	- Meio Man Rogosa e Sharpe modificado
MSC	- Correção De Dispersão Multiplicativa
NRRL	- Agricultural Research Service Culture Collection (ARS)
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
P	- Proteína
PC	- Componentes Principais
PCA	- Análise de Componentes Principais
PCV	- produção de compostos voláteis
QF	- Quociente de Fermentação
Rf	- Refreshments
RM	- Rendimento da Massa
SD	- Sourdough
SDB	- Meio Saboraud Dextrose
SS	- Grânulos Pequenos e Esféricos
TF	- Tempo de Fermentação
TPA	- Análise De Perfil de Textura
TR	- Tempo de Retenção
UPLC	- Cromatografia Líquida de Ultra-Performance
AI	- Amostra do Isolamento
ALBm	- Ágar Luria- Bertani modificado



## LISTA DE SÍMBOLOS

$g$	- Unidade de aceleração
$g\ g^{-1}$	- gramas por grama
$gL^{-1}$	- gramas por litro
M	- Molar
kV	- tensão de aceleração
$mg\ L^{-1}$	- miligramas por grama
mL NaOH 0,1N 10 $g^{-1}$ de massa	- mililitros de NaOH 0,1N utilizados para 10g de massa alcançar o pH de 8,5
mM	- Milimolar
$m\ v^{-1}$	- Massa por volume
rpm	- rotações por minute
UFC	- Unidades formadoras de colônia
$v\ v^{-1}$	- Volume por volume
$\mu g\ g^{-1}$	- microgramas por grama
$\mu m$	- micrometros

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>25</b>
1.1 OS DIFERENTES TIPOS DE <i>SOURDOUGH</i> E OS PROCESSOS PRODUTIVOS.....	26
1.1.1 <i>Sourdough</i> tipo I - Seleção espontânea de micro-organismos .....	28
1.1.2 <i>Sourdough</i> tipo II – uso de culturas iniciadoras .....	30
1.1.3 <i>Sourdough</i> tipo III – <i>sourdough</i> tipo II desidratado .....	32
1.1.4 <i>Sourdough</i> tipo IV – <i>sourdough</i> misto .....	33
1.2 MICROBIOTA DO <i>SOURDOUGH</i> .....	33
1.3 BENEFÍCIOS DO USO DE <i>SOURDOUGH</i> .....	44
1.3.1 Textura .....	45
1.3.2 Presença de Aromas .....	46
1.3.3 Aumento da vida de prateleira.....	52
1.3.4 Aumento do valor nutricional e digestibilidade .....	55
1.4 ENRIQUECIMENTO DO <i>SOURDOUGH</i> COM DIFERENTES VARIEDADES DE FARINHA.....	57
1.5 COMERCIALIZAÇÃO DO <i>SOURDOUGH</i> .....	59
1.6 SÍNTESE .....	63
<b>2 <i>SOURDOUGH</i> BRASILEIRO: EVOLUÇÃO MICROBIOLÓGICA, ESTRUTURAL E TECNOLÓGICA .....</b>	<b>66</b>
2.1 INTRODUÇÃO.....	66
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	67
2.2.1 Preparação e propagação de <i>sourdough</i> .....	67
2.2.2 Parâmetros tecnológicos do <i>sourdough</i> .....	67
2.2.3 pH e acidez titulável (ATT) .....	68
2.2.4 Análises microbiológicas .....	68
2.2.5 Quantificação dos carboidratos (maltose, glicose, frutose e amido) e dos ácidos orgânicos (ácido láctico e acético) .....	68
2.2.6 Compostos voláteis .....	69
2.2.7 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	69

2.2.8	Preparação de amostras de massa para microscopia eletrônica de varredura - MEV	70
2.2.9	Análise estatística	70
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
2.3.1	Cinética de crescimento das BALs e das leveduras	70
2.3.2	Perfil de voláteis durante a fermentação	74
2.3.3	FTIR e Análise de Componentes Principais (PCA)	78
2.3.4	Observação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do <i>sourdough</i>	81
2.4	CONCLUSÕES	84
<b>3</b>	<b>SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO PARA A PRODUÇÃO DE SOURDOUGH TIPO II: IMPACTO NO PERFIL MICROBIANO, BIOQUÍMICO E VOLÁTIL DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO</b>	<b>87</b>
3.1	INTRODUÇÃO	87
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	88
3.2.1	Culturas Iniciadoras	88
3.2.2	Preparação do <i>Sourdough</i>	89
3.2.3	Análises nos <i>sourdoughs</i>	89
3.2.3.1	Análises de pH e ATT	89
3.2.3.2	Produção de CO <sub>2</sub>	90
3.2.3.3	Análises microbiológicas	90
3.2.3.4	Quantificação dos ácidos orgânicos (ácido láctico e acético) e dos carboidratos (maltose, frutose e glicose e amido)	90
3.2.3.5	Identificação dos Compostos Voláteis	91
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	91
3.3.1	Cinética de crescimento	91
3.3.2	Compostos Voláteis	100
3.4	CONCLUSÕES	106
<b>4</b>	<b>INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DAS CULTURAS INICIADORAS NAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E NA EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS NO SOURDOUGH TIPO II E NOS PÃES DE TRIGO</b>	<b>110</b>
4.1	INTRODUÇÃO	110
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	111
4.2.1	Micro-organismos	111
4.2.2	Produção do <i>sourdough</i>	112

4.2.3	Análises nos <i>sourdoughs</i> .....	112
4.2.3.1	Análises de pH e ATT .....	112
4.2.3.2	Produção de CO <sub>2</sub> .....	113
4.2.3.3	Análises microbiológicas .....	113
4.2.3.4	Quantificação dos ácidos orgânicos (ácido láctico e acético) e dos carboidratos (maltose, glicose, frutose e amido) .....	113
4.2.3.5	Identificação dos compostos voláteis .....	114
4.2.4	Produção dos pães.....	114
4.2.5	Análise das qualidades dos pães .....	115
4.2.6	Análise estatística.....	115
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	116
4.3.1	Características Microbiológicas e Tecnológicas dos <i>Sourdoughs</i> .....	116
4.3.2	Análise de Componentes Principais (PCA) .....	121
4.3.3	Avaliação dos pães.....	123
4.4	CONCLUSÕES.....	126
<b>5</b>	<b>INFLUÊNCIA DO SOURDOUGH E DA REUTERICICLINA NA PREVENÇÃO DO ROPE SPOILAGE.....</b>	<b>130</b>
5.1	INTRODUÇÃO.....	130
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	131
5.2.1	Cepas e condições de culturas.....	131
5.2.2	Produção da suspensão de esporos .....	132
5.2.3	Produção de Pão e Inoculação <i>Bacillus</i> .....	132
5.2.3.1	Contagem de células vegetativas e de esporos de <i>Bacillus</i> .....	133
5.2.3.2	Avaliação do pH.....	133
5.2.4	Avaliação do <i>rope spoilage</i> .....	133
5.2.4.1	Avaliação visual e aroma frutado.....	133
5.2.5	Produção do <i>sourdough</i> .....	134
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	134
5.3.1	Influência da quantidade do <i>operon spoVA</i> <sup>2mob</sup> na resistência térmica do <i>Bacillus</i> e no desenvolvimento do <i>rope spoilage</i> .....	134
5.3.2	Influência da adição do <i>sourdough</i> fermentado com <i>Lactobacillus reuteri</i> e da reuteriicina na redução do <i>rope spoilage</i> .....	140
5.4	CONCLUSÕES.....	143
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>144</b>

6.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	145
	REFERÊNCIAS.....	146
	APÊNDICE A - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO EM FARINHAS DE TRIGO E TRIGO.....	175
	APÊNDICE B- PERFIL VOLÁTIL DE <i>SOURDOUGHS</i> TIPO II FERMENTADO A 28 °C (A) E A 35 °C (B) COM DIFERENTES CULTURAS INICIADORAS .....	177
	ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA FOOD AND BIOPROCESS TECHNOLOGY (QUALIS A1 PARA CIÊNCIA DE ALIMENTOS) REFERENTE AO ARTIGO 1 DESTE DOCUMENTO .....	180
	ANEXO B - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY (QUALIS A2 PARA CIÊNCIA DE ALIMENTOS) REFERENTE AO ARTIGO 2 DESTE DOCUMENTO.....	181
	ANEXO C - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA LWT- FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY (QUALIS A1 PARA CIÊNCIA DE ALIMENTOS) REFERENTE AO ARTIGO 4 DESTE DOCUMENTO .....	182
	ANEXO D - AUTORIZAÇÃO PARA REPUBLICAÇÃO DOS ARTIGOS NA FORMA DE TESE.....	183

## INTRODUÇÃO

O *sourdough* é definido como uma massa a base de farinha fermentada por leveduras e bactérias ácido-láticas (BAL), o qual é utilizado como esponja-massa ou agente fermentativo na produção de produtos de panificação. Em comparação aos produtos fermentados apenas com leveduras, o *sourdough* possui vida útil prolongada, resultante da produção de antifúngicos bacteriocinas e maior acidez; melhor qualidade sensorial devido a maior elasticidade e concentração de compostos voláteis e redução dos compostos antinutricionais, como os fitatos, garantindo uma melhor qualidade nutricional.

A produção do *sourdough* é considerada um dos processos biotecnológicos mais antigos utilizados na fabricação de alimentos à base de cereais. Iniciou-se com a produção do *sourdough* tradicional ou tipo I caracterizado por uma fermentação lenta, iniciada pela microbiota da própria farinha e/ou do meio. Durante o processo fermentativo são realizadas alimentações ou propagações diárias que auxiliam na seleção das BALs e leveduras, visto que na farinha de trigo diferentes micro-organismos são encontrados, como bactérias entéricas, *Bacillus* e mofo.

Para acelerar o processo fermentativo, iniciou-se a adição de culturas iniciadoras (*starters*) constituídas de BAL com ou sem leveduras ou inóculos, como frutas, flores e mel, dando início a produção do *sourdough* tipo II. Devido à alta carga bacteriana adicionada, a microbiota da farinha é inibida ou suprimida, e desta forma é possível obter *sourdoughs* com maior padronização. No entanto, BAL que produzem alta acidez podem inibir o crescimento de leveduras *autóctones* e causar a hidrólise excessiva do glúten. Portanto, a seleção das BAL é uma etapa essencial.

Além dos ácidos orgânicos algumas BALs produzem compostos antimicrobianos que retardam o crescimento de bactérias patogênicas e dos *Bacillus*. Nos pães, os *Bacillus* são responsáveis pelo *rope spoilage*, que causa a degradação acelerada dos produtos.

Apesar da tecnologia do *sourdough* resultar em produtos com alta qualidade, no Brasil a sua utilização encontra-se limitada em panificadoras mais tradicionais. Nos últimos anos, diversos estudos foram conduzidos para identificar a microbiota presente no *sourdough* tradicional e os benefícios da adição de inóculos e/ou culturas iniciadoras. Entretanto, as modificações ocorridas no glúten e amido durante

a fermentação lenta, assim como o desenvolvimento de aromas em conjunto com a cinética de crescimento das BALs e leveduras ainda não foram avaliados. Por isso, esta tese teve como objetivo estudar as modificações bioquímicas e estruturais ocorridas durante a fermentação do *sourdough* tradicional. Em adição, no *sourdough* tipo II foram avaliadas a cinética de crescimento, produção de compostos voláteis e dos parâmetros tecnológicos de 11 BALs em fermentação individual e em co-cultivo, assim como o efeito da adição do *sourdough* fermentado com a *L. reuteri* produtora e não de reuteri ciclina na inibição do *rope spoilage*.



## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar as alterações no glúten e no amido durante a fermentação do *sourdough* tradicional, além de selecionar uma cultura iniciadora adequada para a produção do *sourdough* tipo II com acidez dentro do recomendado e com maior presença de compostos aromáticos, e de avaliar o efeito da adição do *sourdough* e da reuteriicina no aumento do *shelf-life* de pães.

### Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a cinética de crescimento, os parâmetros físico-químicos (pH, acidez titulável) e tecnológicos (quociente de fermentação, produção de CO<sub>2</sub> e de compostos voláteis e alterações químicas no amido e glúten) no *sourdough* tipo I
- ✓ Estudar a cinética de crescimento, parâmetros físico-químicos (pH, acidez titulável) e tecnológicos (quociente de fermentação, produção de CO<sub>2</sub> e de compostos voláteis) das BALs: *Lactobacillus acidophilus*, *L. amilovor**us*, *L. brevis*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. jhonsonii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. sakei*, *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus* no meio *sourdough* tipo II;
- ✓ Selecionar um conjunto de BAL homofermentativas e heterofermentativas para estudo da cinética em co-cultivo e seleção de uma cultura iniciadora;
- ✓ Produzir um pão por meio do processo indireto, utilizando o *sourdough* tipo II fermentado com a cultura iniciadora selecionada e avaliar a textura e o volume comparando com um pão controle produzido pelo processo direto;
- ✓ Verificar o impacto da adição do *sourdough* fermentado com a *L. reuteri* produtora e não produtora de reuteriicina na redução de *rope spoilage* em pão.

**ARTIGO I**  
**REVISÃO DE LITERATURA**  
**VISÃO GERAL DA TECNOLOGIA *SOURDOUGH*: DA PRODUÇÃO À**  
**COMERCIALIZAÇÃO**

Este artigo foi publicado na revista Food and Bioprocess Technology – Anexo A

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### Visão geral da tecnologia *sourdough*: da produção à comercialização

O *Sourdough* é definido como uma massa de farinha e água fermentada por leveduras e bactérias de ácido láctico (BALs), utilizada como agente fermentativo para a produção de produtos de panificação (LÖNNER *et al.*, 1986; HAMMES e GÄNZLE, 1998; CHAVAN e CHAVAN, 2011). As farinhas mais utilizadas são de centeio ou trigo, embora farinhas de outras fontes também possam ser utilizadas para produção e propagação, como a farinha de quinoa (IGLESIAS-PUIG *et al.*, 2015; RIZZELLO *et al.*, 2016), semolinas (*Triticum durum*) (ALFONZO *et al.*, 2017), amaranto (MACHADO ALENCAR *et al.*, 2015), trigo mourisco (STOKIĆ *et al.*, 2015; AGUILAR *et al.*, 2016) e chia (*Salvia hispanica*) (COSTANTINI *et al.*, 2014). A tecnologia do *sourdough* é considerada um dos processos biotecnológicos mais antigo dos utilizados para obter alimentos à base de cereais (CHAVAN e CHAVAN, 2011), antes da produção do fermento comercial. Inicialmente, foi obtido a partir da fermentação espontânea de micro-organismos presentes na farinha (LÖNNER *et al.*, 1986; HAMMES e GÄNZLE, 1998) ou em outras matérias-primas (RIPARI, GÄNZLE, *et al.*, 2016). A fermentação espontânea (apenas farinha e água) leva quase uma semana e, no final, as BALs frequentemente identificadas são *Lactobacillus sanfranciscensis*, *L. plantarum* e *Weissella cibaria*, em conjunto com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania exigua* e *Candida humilis*.

Recentemente, a fermentação rápida usando apenas o fermento comercial é o processo mais utilizado para a produção industrial de pães. No entanto, algumas padarias tradicionais ainda utilizam *sourdough* propagado por mais de 100/150 anos (CAPPELLE *et al.*, 2013; RIPARI, GÄNZLE, *et al.*, 2016). O *sourdough* tornou-se incorporado à cultura de países como os Estados Unidos da América, Itália, Alemanha e França. Nestes países, também é possível obter no mercado local *sourdoughs* desidratados usados para produção em pequena escala de pão, bolos, panquecas e outros produtos.

Em comparação com os produtos fermentados apenas por leveduras, os produtos obtidos por fermentação indireta (*sourdough*) possuem vida útil mais longa, devido a produção de compostos antifúngicos (HAMMES e GÄNZLE, 1998; MANINI *et al.*, 2016), bacteriocinas (MESSENS e DE VUYST, 2002; NEYSENS, 2003;

NEYSENS e DE VUYST, 2005) e da maior acidez (MESSENS e DE VUYST, 2002; GÄNZLE, 2004; POUTANEN *et al.*, 2009); maior qualidade sensorial em virtude da maior elasticidade (TAKEDA *et al.*, 2001; CLARKE *et al.*, 2004), umidade interna (CORSETTI, 2013) e concentração de compostos voláteis (MAKHOUL *et al.*, 2015); e o aumento da biodisponibilidade de nutrientes devido à redução de compostos antinutricionais, como fitatos (LEENHARDT *et al.*, 2005; GÄNZLE, 2014).

Vários estudos já foram conduzidos para avaliar o sinergismo envolvido na co-cultura das BAL e das leveduras, e para identificar a microbiota predominante na massa (BRANDT, 2007; BELITZ *et al.*, 2008; DE VUYST *et al.*, 2009; ROCHA e MALCATA, 2012; MINERVINI *et al.*, 2015), bem como compreender as reações químicas e bioquímicas causadas pela liberação de metabólitos durante a fermentação (GOBBETT *et al.*, 1995; MARTI *et al.*, 2014).

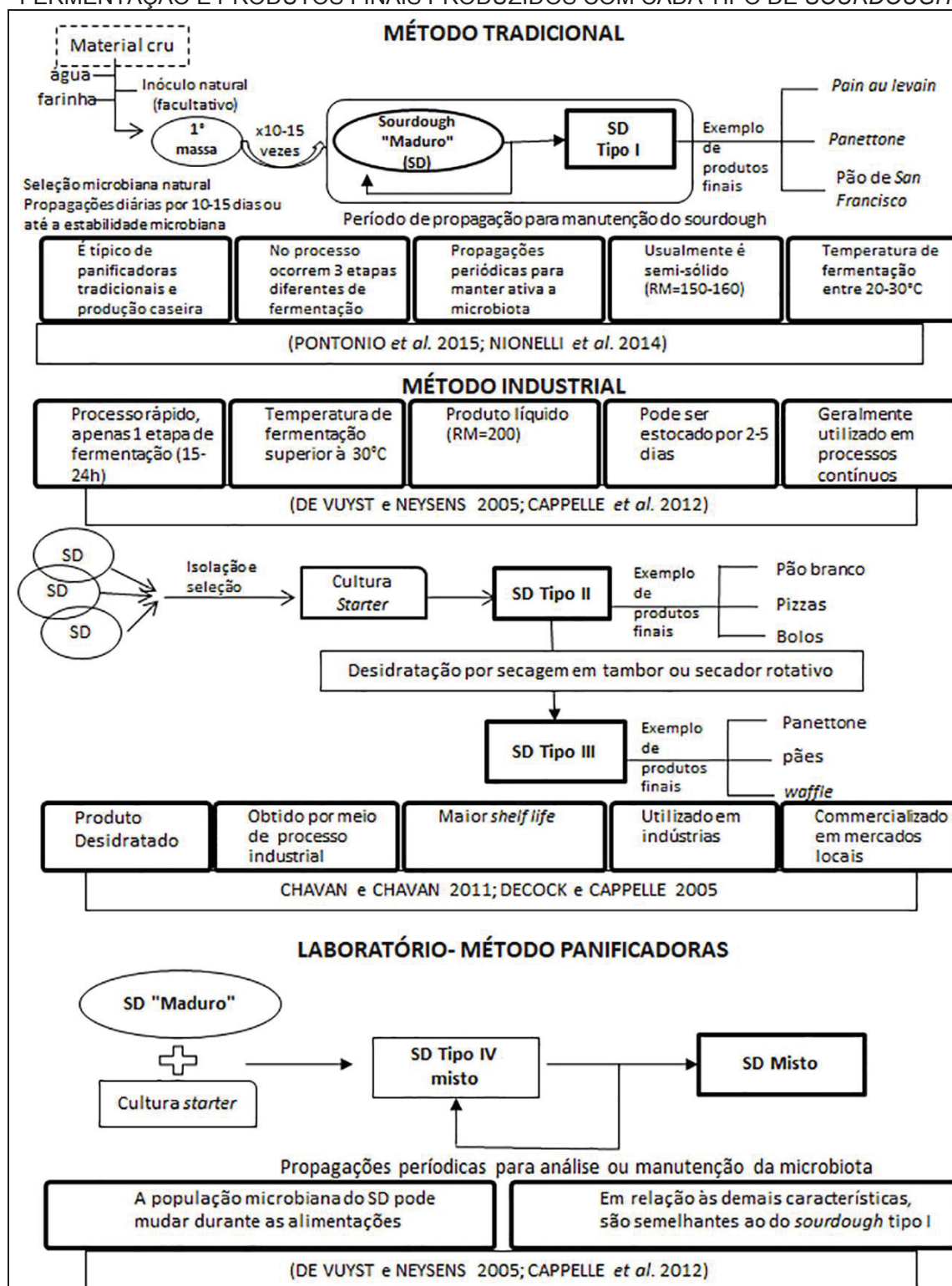
Na literatura, é possível encontrar vários estudos, revisões e livros sobre *sourdough*. No entanto, este artigo de revisão procura trazer informações atualizadas sobre o processo de *sourdough*, principais fatores que afetam o produto, a variedade de micro-organismos isolados entre 2011 e 2016 em *sourdough* tipo I, substratos e processos utilizados. Além disso, os benefícios nas características de textura e aroma e a redução de anti-nutricional; são explicados e discutidos. Também são apresentadas variedades de *sourdough* desidratado (diferentes farinhas e aplicações), comercialmente disponíveis em todo o mundo.

## 1.1 OS DIFERENTES TIPOS DE SOURDOUGH E OS PROCESSOS PRODUTIVOS

Do ponto de vista tecnológico, o *sourdough* pode ser classificado em quatro tipos distintos (BÖCKER *et al.*, 1995). Para a sua classificação, são considerados o processo de produção e a consistência da massa. A consistência da massa é determinada pelo rendimento da massa (RM), que se refere à proporção de farinha e água, e pode ser calculado usando a equação: rendimento da massa (RM) (%) = (quantidade de farinha + quantidade de água) x100 / quantidade de farinha. Na fase de adaptação microbiana, os diferentes fatores ambientais e parâmetros tecnológicos têm influência direta na seleção e desempenho da microbiota (DECOCK e CAPPELLE, 2005; CAPPELLE *et al.*, 2013; GOBBETTI *et al.*, 2014).

Esta pesquisa foca os quatro processos utilizados para a produção de *sourdough*. Por este motivo, quatro agrupamentos de *sourdough* foram descritos (FIGURA 1).

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA APRESENTANDO OS MÉTODOS UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DO SOURDOUGH, CONTENDO AS ETAPAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO E AS CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO E PRODUTOS FINAIS PRODUZIDOS COM CADA TIPO DE SOURDOUGH



### 1.1.1 *Sourdough* tipo I - Seleção espontânea de micro-organismos

O *sourdough* Tipo I é geralmente produzido por meio de uma massa firme (RM 150-160), e pelo método tradicional, caracterizado pela fermentação espontânea, iniciada pelas cepas microbianas presentes na primeira massa e sob temperatura ambiente (20-30 °C) (BÖCKER *et al.*, 1995; HAMMES e VOGEL, 1995; HAMMES e GÄNZLE, 1998; NIONELLI *et al.*, 2014). A primeira massa pode ser preparada usando apenas farinha e água ou pela adição de outra matéria-prima naturalmente rica em micro-organismos (chamados de inóculos), como frutas, iogurte, cortes de rúmen e estrume (RIPARI, CECCHI, *et al.*, 2016). A seleção da microbiota do fermento ocorre espontaneamente durante a propagação diária também chamada de *backslopping* ou *refreshment*. A propagação diária é repetida de 5 a 10 vezes, dependendo dos micro-organismos presentes no início do processo e das propriedades sensoriais desejadas no produto (BÖCKER *et al.*, 1995; HAMMES e GÄNZLE, 1998). Para entender como a microbiota muda durante o ciclo de fermentação até a obtenção de *sourdough* maduros, vários estudos foram realizados.

A preparação de fermento no laboratório difere das práticas artesanais pois a farinha é a única matéria-prima não estéril utilizada. Dentro da primeira massa, a população microbiana é composta por diferentes gêneros de micro-organismos, entre eles também os formadores de esporos, bactérias entéricas e o mofo, os quais não são adequados para o processo de panificação (ROCHA e MALCATA, 2016). De fato, a primeira população reflete a microbiota presente na matéria-prima usada, Gram-positiva (ex., *Micrococcaceae*), Gram-negativas (ex., *Enterobacteriaceae*), fungos (leveduras e bolores), BAL, bactérias aeróbicas (ex. *Gluconobacter* sp.). Quando o potencial redox da massa diminui, anaeróbios facultativos, como *Enterobacteriaceae* e *Micrococcaceae*, BALs e leveduras são favorecidos. Durante a próxima propagação, a diminuição do pH, leva à fermentação do ácido láctico, inibindo todo o micro-organismo sensível à acidez e ao ácido orgânico produzido. Posteriormente, ocorre uma seleção de três passos de BALs (ERCOLINI *et al.*, 2013). No início, as BALs em baixa concentração como *Enterococcus* sp., *Lactococcus* sp., gradualmente *Pediococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Weissella* sp. e *Lactobacillus* sp., e no final, espécies de BALs bem adaptadas, como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus brevis*.



Ripari et al. (2016) descreveram que o uso de material vegetal, como: frutas de *Punica granatum* e flores de *Veronica persica*, como inóculos na primeira massa (uma prática artesanal comum para produzir novos *sourdoughs*), estabilizou rapidamente a microbiota. Em particular, *Enterobacteriaceae*, bacilo ou *Staphylococcus* não foram detectados em nenhum estágio de desenvolvimento, bactérias do ácido láctico (*Enterococcus* sp.) estavam presentes somente após o primeiro ciclo de fermentação, mas logo foram substituídas por BALs adaptadas ao *sourdough*. Após quatro ciclos de fermentação, bactérias de ácido acético (AAB) estavam presentes em quatro dos sete *sourdough*. O uso de inóculos na primeira preparação de massa levou a obter uma massa adequada em pouco tempo, graças à aceleração da seleção da microbiota devido à presença inicial de nutrientes disponíveis e micro-organismos pró-tecnológicos (SU et al., 2012; RIPARI, GÄNZLE, et al., 2016).

Uma vez obtido o *sourdough* estável ou maduro, este é usado como agente natural de fermentação, também conhecido como "esponja" ou "massa-mãe" na produção de uma enorme variedade de pão tradicional ou outros produtos de panificação, como pão de São Francisco, *panettone*, pão francês, *pain au levain*, pão de centeio (FIGURA 1). A microbiota encontrada no *sourdough* do tipo I é composta principalmente por BALs heterofermentativas, heterofermentativas facultativas e homofermentativas, como: *Lactobacillus brevis*, *L. sanfranciscensis*, *L. fermentum*, *Leuconostoc citreum*., *L. plantarum* e *Pediococcus pentosaceus* (CORSETTI, 2013; MARIOTTI et al., 2014; MINERVINI et al., 2015); e leveduras das espécies *S. cerevisiae* e *C. humilis* (LACUMIN et al., 2009; VALMORRI et al., 2010; MINERVINI et al., 2015) como pode ser visto na Tabela 1. As BALs heterofermentativas fermentam a maltose pela via da fosforilase e a glicose por meio da via de gluconato, produzindo concentrações equimolares de lactato, etanol ou ácido acético e CO<sub>2</sub>. A maltose é o açúcar simples presente em maior concentração na massa, causando um metabolismo de carboidratos altamente adaptado, por essas BALs em *sourdough* tradicionais (HAMMES e VOGEL, 1995; DE VUYST e NEYSENS, 2005; CORSETTI e SETTANNI, 2007). Além disso, as BALs heterofermentativas crescem a temperaturas mais baixas, o que também favorece o crescimento em *sourdough* tipo I (BRANDT, 2007).

Além da BAL e da levedura, o *sourdough* ocasionalmente pode hospedar bactérias de ácido acético, como o *Acetobacter* sp. (SCHEIRLINCK et al., 2008;



RIPARI, GÄNZLE, *et al.*, 2016) ajudando na rápida acidificação da massa e influenciando os compostos voláteis no produto final. A proporção de BALs e leveduras presente no *sourdough* tipo I, pode variar dependendo da microbiota presente nos ingredientes. Ripari *et al.* (2016) e Dertli *et al.* (2016) encontraram a proporção de 100: 1 (BAL: levedura), semelhante ao adicionado no *sourdough* de tipo II. No entanto, Michel *et al.* (2016) avaliaram dezesseis *sourdoughs* franceses obtendo a proporção de 1000: 1 em 2 amostras, 100: 1 em 10 amostras; 10: 1 em 3 amostras e 1 amostra de *sourdough* mostrou a mesma concentração de BAL e leveduras. Lhome *et al.* (2015) também verificaram uma grande variação na proporção de BAL e levedura variando de 10000: 1 a 10: 1.

O uso do *sourdough* espontâneo requer processos de trabalho árduo e demorado e mão-de-obra especializada, mas a seleção natural dos micro-organismos *autóctones* permite a produção de um fermento específico e diferente que abriga um conjunto distinto de levedura-BAL. Cada *sourdough* é um ecossistema natural diferente que pode ser utilizado na produção de diferentes tipos de pães. O metabolismo microbiano é específico de cada cepa, os demais tópicos explicam sua capacidade de modificar a massa gerando grande qualidade aos produtos à base de *sourdough* em relação ao pão convencional. O *sourdough* tipo I pode ser mantido durante anos por propagação contínua utilizando o lote anterior como inóculo.

#### 1.1.2 *Sourdough* tipo II – uso de culturas iniciadoras

O *sourdough* tipo II é produzido por um processo conhecido como método industrial, uma vez que ocorre em um único passo de fermentação (15-24 horas) apenas por BALs e/ou levedura (DE VUYST *et al.*, 2014). Neste tipo de fermento, as culturas *starters* são adicionadas em uma proporção de 100: 1 BAL: levedura. Esta cultura iniciadora pode dominar ou inibir o crescimento de microbiota *autóctone* da massa por serem adicionados em alta concentração. A adição de cultura iniciadora acidifica a massa mais rapidamente do que o fermento tradicional, de modo que as BALs mais utilizadas neste tipo de massa devem ser ácido tolerante, como *L. amilovorus*, *L. panis*, *L. pontis* e *L. reuteri* (BÖCKER *et al.*, 1995; HAMMES e GÄNZLE, 1998; HUYS *et al.*, 2013). Devido à adição das culturas *starters*, o processo de fermentação utilizando o *sourdough* tipo II é realizado a temperaturas

mais altas, superiores a 30 °C (GOBBETTI, 1998; CORSETTI, 2013), o que permite uma rápida e alta acidificação que pode inibir o crescimento das leveduras *autóctones*. Portanto, no *sourdough* tipo II a levedura pode ser adicionada no final do processo de fermentação (DE VUYST *et al.*, 2016). De acordo com Spicher e Stefan, (1999) a temperatura afeta a taxa de fermentação e a composição microbiana da massa fermentada. Meroth *et al.* (2003) produziram dois tipos de *sourdough* tipo II de centeio, utilizando um *sourdough* comercial tipo III e leveduras comerciais como culturas iniciadoras e realizaram a fermentação a temperaturas de 30 °C e 40 °C. Na massa fermentada a 30 °C, as BALs predominante encontradas foram: *L. pontis*, *L. fermentum* e *S. cerevisiae*. No entanto, quando o processo foi realizado a 40 °C houve um crescimento abundante da *L. crispatus*, *L. panis* e *L. frumenti*, bem como uma inibição total das leveduras. Essas observações demonstram que a microbiota presente no fermento final é fortemente influenciada pela temperatura de fermentação e pela cultura iniciadora utilizada.

Diferentemente do *sourdough* tipo I, o tipo II tem temperatura controlada e geralmente é produzido em biorreatores equipados com sensores. A massa tem uma consistência mais líquida (RM acima de 200), a fim de permitir o uso em padarias industriais devido à sua maior facilidade de bombeamento e dosagem sem gerar poeira (SPICHER e STEPHAN, 1993; BÖCKER *et al.*, 1995). Após a produção, o *sourdough* tipo II é estabilizado por resfriamento. Para a desativação da cultura iniciadora e a interrupção da produção de dióxido de carbono e ácidos orgânicos, adiciona-se cloreto de sódio (NaCl) ou realiza-se a pasteurização (DECOCK e CAPPELLE, 2005; BRANDT, 2007) para em seguida armazenar a massa. Durante o armazenamento, de 1 a 3 dias, parte do *sourdough* maduro pode ser usado como fermento para a produção de pães, resultando em um produto final com maior acidez e aromas do que o pão tradicional (CORSETTI, 2013).

O *sourdough* tipo II apresenta várias vantagens em relação ao *sourdough* tipo I, como: apenas um passo de fermentação, melhor controle sobre os parâmetros de fermentação (temperatura, pH, acidez) e maior facilidade na adição de nutrientes, resultando em melhor desempenho e controle sobre o metabolismo microbiano (MASTILOVIC *et al.*, 2001). Assim, é possível reduzir o risco de contaminação por fungos filamentosos durante o processo de fermentação devido a uma fermentação mais rápida, bem como melhorar as propriedades sensoriais, padronizar os produtos finais através da seleção da cultura iniciadora além de posterior indução da

produção de metabólitos relevantes. Essas qualidades tornam o *sourdough* tipo II ideal para uso em processos industriais. Devido à composição microbiana muito complexa do *sourdough*, um passo crítico é a seleção de cepas a serem utilizadas para a cultura iniciadora. Um protocolo para a produção e uso de um iniciador de *sourdough* semi-líquidos multi-espécies definido para satisfazer requisitos industriais o qual é proposto em Gaggiano et al. (2007).

#### 1.1.3 *Sourdough* tipo III – *sourdough* tipo II desidratado

O *sourdough* tipo III é produzido por desidratação da forma estabilizada do *sourdough* tipo II. A seleção da cultura iniciadora baseia-se na sua capacidade de acidificar rapidamente a mistura de farinha-água e/ou a sua capacidade de produzir sabores específicos (DE VUYST *et al.*, 2014). Algumas empresas que comercializam o *sourdough* de tipo III não asseguram a viabilidade da microbiota do *sourdough*, por isso, este tipo de produto é mais usado para melhorar a textura e o aroma dos produtos finais, mas é necessário a adição de levedura de panificação para permitir a fermentação. A maioria das empresas que produzem *sourdoughs* tipo III asseguram uma cultura iniciadora estável. Desta forma pode ser utilizada como esponja ou fermento na produção de produtos de panificação após a reidratação. Para o tratamento de desidratação deste *sourdough* estável deve ser considerada a estabilidade do micro-organismo. Alguns exemplos de BALs resistentes à secagem são: *P. pentosaceus*, *L. plantarum* e *L. brevis* (BÖCKER *et al.*, 1995).

As técnicas de secagem mais utilizadas são: a liofilização e secagem por tambores com um secador rotativo (DECOCK e CAPPELLE, 2005; CHAVAN e CHAVAN, 2011). Na secagem por tambor, a água é evaporada enquanto as pequenas gotas de fermento ainda estão no ar sem entrarem em contato com o equipamento, evitando a reação de *Maillard* (DECOCK e CAPPELLE, 2005). Durante o processo de secagem rotativa, formam-se compostos que conferem ao produto sabor e aroma de malte caramelizado e torrado devido às altas temperaturas necessárias para o processo. Este processo também resulta em uma redução no ácido acético, que é volatilizado a 113 °C (DECOCK e CAPPELLE, 2005; BRANDT, 2007; CHAVAN e CHAVAN, 2011). Até o momento, não foi realizado nenhum estudo para avaliar se essas diferenças são perceptíveis aos consumidores. No entanto, de acordo com Bocker et al. (1995), um nível mais

elevado de padronização das características sensoriais dos produtos finais pode ser obtido usando *sourdough* tipo III devido ao uso inicial da cultura iniciadora. Além disso, por ser desidratado, este produto possui menor volume, facilitando o manuseio, transporte e armazenamento quando comparado com o *sourdough* tipo I e II. Essas características, juntamente com uma vida útil mais longa, explicam o uso frequente do *sourdough* tipo III por padarias industriais e sua comercialização em supermercados. Além disso, neste caso, o passo crítico é a seleção da cultura iniciadora, as quais devem também ser resistentes aos processos de secagem utilizados.

#### 1.1.4 *Sourdough* tipo IV – *sourdough* misto

Um outro tipo de *sourdough*, típico de estudos laboratoriais ou de algumas padarias artesanais, é o *sourdough* misto (SIRAGUSA *et al.*, 2009; DE VUYST *et al.*, 2014). Neste caso, o *sourdough* é iniciado por uma cultura iniciadora (apenas levedura comercial, apenas BAL ou mistura de BAL e levedura) e propagado como o *sourdough* tradicional. Neste caso, a cultura iniciadora pode ser influenciada pela dispersão e deriva de outros micro-organismos. Se as cepas mais competitivas ou bem adaptadas forem a dispersão na massa, isso levará ao seu domínio na microbiota do *sourdough*. Portanto, uma seleção natural ocorrerá entre as espécies adequadas ao desenvolvimento do ecossistema do *sourdough*. Na verdade, a cultura iniciadora poderia ser menos competitiva e, portanto, menos adaptável às condições ambientais dos ecossistemas do *sourdough* (MINERVINI *et al.*, 2010).

## 1.2 MICROBIOTA DO SOURDOUGH

A microbiota encontrada no *sourdough* geralmente consiste em um crescimento associativo de lactobacilos e leveduras, favorecidos pela similaridade entre as respectivas condições (temperatura e pH) necessárias para o seu crescimento (CORSETTI, 2013).

Muitos estudos têm sido realizados ao longo dos últimos anos para identificar as diferentes microbiotas presente nas farinhas de trigo, centeio e vegetais e nos *sourdoughs*. A Tabela 1 apresenta uma compilação dos resultados de artigos que realizaram o isolamento e identificação de BAL e levedura em *sourdoughs* tipo I entre os anos de 2010-2016.

Pode ser visto na Tabela 1 que, durante este período, o processo de produção -do *sourdough* foi muito estudado, utilizando diferentes parâmetros ( $T^{\circ} = 20-30$ ; RM = 140-400; Tempo de fermentação total = 10-80 dias) e matérias-primas, tanto na produção de *sourdoughs* tradicionais comercializados em padarias de diferentes países, bem como nos produzidos em laboratórios. Devido à diversificação na produção destes *sourdoughs*, é possível observar uma grande variedade nas espécies de BALs isoladas, sendo as mais frequentemente encontradas, a *L. brevis*; *L. sanfranciscensis*, *L. plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*, juntamente com *S. cerevisiae*. Estes resultados são semelhantes aos discutidos por De Vust et al. (2014). Além destas cepas de BALs, o *L. fermentum*; *L. rossiae*; *Ln. citreio*; *Ln. mesenteroides*; *W. cibaria*; *W. confuso*; *L. curvatus* também estão presentes em muitos *sourdoughs* investigados. Em contraste, o *L. acetotolerans*; *L. farraginis*; *L. frumentii*; *L. hammessi*; *L. parabrevis*; *L. reuteri*; *L. spicherum*; *L. viridescens*; *L. pentosus*; *L. garviae* e *P. acidilactici*, foram encontrados em alguns estudos, assim como as leveduras *K. servazzii* e *S. bayanus*.

TABELA 1 – COMPILAÇÃO NÃO EXAUSTIVA DAS BACTÉRIAS HETEROFERMENTATIVAS, HETEROFERMENTATIVAS FACULTATIVAS E B=HOMOFERMENTATIVAS E LEVEDURAS ISOLADAS EM SOURDOUGHS PRODUZIDOS COM DIFERENTES FARINHAS.

(continua)

Parâmetros tecnológicos utilizados na produção do <i>sourdough</i>									
Micro-organismo <sup>a</sup>	T (°C) <sup>b</sup>	RM <sup>c</sup>	RF <sup>d</sup> cada (h)	Far. Rf <sup>e</sup>	AI <sup>f</sup>	TF <sup>g</sup> (dias)	Tipo de farinha	País	Referência(s)
<b>BAL</b>									
Heterofermentativa									
<i>L. acetotolerans</i>	Nd	Nd	24h	1	1	10	Trigo (BAL presente no 10° dia de fermentação)	França	Vera et al., 2012
<i>L. brevis</i>	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 4 de 12 <i>sourdough</i> (SD) analisados)	Turkey	Dertli et al., 2016
	30	400	24h	1	1	10	Trigo (SD com pH livre)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	30	400	24h	1	1	12	Trigo (SD com pH mínimo= 4,0)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	30	400	24h	1	1	10	Centeio (SD Laboratório)	Bélgica	Harth et al., 2016
	30	160	nd	nd	2	21h	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 2 de 19 SD analisados)	Itália	Alfonzo et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo - FB SD (BAL presente em 2 de 6 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo (SD. D) (BAL presente em 1 de 7 SD analisados)	Itália	Ripari et al., 2016
	18	357	24h	1	1	13	Farelo de Trigo	Itália	Manini et al., 2014
	30	160-350	24h	2	2	10	Trigo e vegetais (grão-bico; lentilha e feijão)	Itália	Rizello et al., 2014
	20-23	Nd	24h	1	2	7	Farinha de Mistura (Whole flour, maize, sorghum, Trigo, finger millet, teff, centeio e malt)	Etiópia	Abegaz, 2014
<i>L. parabruchneri</i>									
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 1 de 18 <i>sourdough</i> analisados)	Itália	Lattanzi et al., 2013
	23-25	150-250	3-13h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 1 de 5 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2012
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 6 de 11 SD analisados)	Itália	Reale et al., 2010
	*	*	*	*	2	*	Trigo – SD. Ind (BAL presente em 1 de 5 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
<i>L. diolivorans</i>									
	30	160-350	24h	2	2	10	Trigo e vegetais (grão-bico; lentilha e feijão)	Itália	Rizello et al., 2014
	*	*	*	*	2	*	Trigo –SD. Ind (BAL presente em 1 de 5 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 2 de 13 SD analisados)	França	Lhome et al., 2015
<i>L. farraginis</i>									
<i>L. fermentum</i>									
	30	400	24h	1	1	10	Trigo (BAL presente em 13 de 13 SD analisados)	França	Lhome et al., 2015
	17-22	200	17h	1	2	10	Centeio (SD Laboratório)	Bélgica	Harth et al., 2016
	30	400	24h	1	1	12	Centeio (SD de Padaria)	Bélgica	Harth et al., 2016
	30	160-350	24h	2	2	10	Trigo ( <i>sourdough</i> com pH mínimo=4,0)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo e vegetais (grão-bico; lentilha e feijão)	Itália	Rizello et al., 2014
	25	200	12h	1	2	10	Arroz e Trigo	Itália	Lattanzi et al., 2013
	35	275	24h	1	2	12	Trigo sarraceno	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
							Trigo sarraceno	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011

(continua)

Parâmetros tecnológicos utilizados na produção do *sourdough*

Micro-organismo <sup>a</sup>	T (°C) <sup>b</sup>	RM	RF <sup>d</sup> (h)	Far. Rf <sup>e</sup>	SI <sup>f</sup>	TF <sup>g</sup> (dias)	Tipo de farinha	País	Referência(s)
<i>L. frumenti</i>	Nd	Nd	24h	1	1	10	Trigo (BAL presente no 1° - 5° dia de fermentação)	França	Vera et al., 2012
<i>L. hammesii</i>	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 3 de 13 SD analisados)	França	Lhome et al., 2015
<i>L. hilgardii</i>	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 1 de 13 SD analisados)	França	Lhome et al., 2015
<i>L. koreensis</i>	*	*	*	*	2	*	Trigo -SD Ind. (BAL presente em 1 de 5 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 1 de 13 SD analisados)	França	Lhome et al., 2015
<i>L. panis</i>	Nd	Nd	24h	*	2	10	Trigo (BAL presente em 3 de 13 SD analisados)	França	Lhome et al., 2015
	*	*	*	1	1	*	Trigo (BAL presente no 1° - 5° dia de fermentação)	França	Vera et al., 2012
<i>L. parabravis</i>	23-25	150-250	3-13h	1	2	20-80	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 1 de 5 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2012
<i>L. pontis</i>	*	*	*	*	2	*	Trigo -SD Ind. (BAL presente em 1 de 5 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
	*	*	*	1	2	*	Trigo (BAL presente em 1 de 4 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2015
	*	*	*	*	2	*	Arroz (BAL presente em 1 de 2 SD analisados)	França	Lhome et al., 2015
<i>L. reuteri</i>	35	275	12h	1	2	13	Teff	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
	*	*	*	1	2	*	Trigo (BAL presente em 1 de 4 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2015
<i>L. rossiae</i>	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 4 de 12 SD analisados)	Turquia	Dertli et al., 2016
	30	160	16h	2	2	4	Trigo 80% + Quinoa 20% (Argentina Quinoa)	Itália / Argentina	Rizzelo et al., 2016
	20-25	200	48h	2	1	20	Trigo + Bagas de <i>Myrtus communis</i>	Itália	Ripari et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo (SD. td) (BAL presente em 1 de 7 SD analisados)	Itália	Ripari et al., 2016
	30	160-350	24h	2	2	10	Trigo e vegetais (grão-bico; lentilha e feijão)	Itália	Rizello et al., 2014
<i>L. sanfranciscensis</i>	23-25	150-250	3-13h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 1 de 4 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2012
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente in 4 of 12 sourdough analisados)	Turquia	Dertli et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo - SD FB (BAL presente em 6 de 6 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo - SD Ind. (BAL presente em 3 de 5 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo -SD At (BAL presente em 4 de 5 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
	20-25	200	48h	2	1	20	Trigo + vinagre-mãe	Itália	Ripari et al., 2016
	20-25	200	48h	2	1	20	Trigo +flores <i>Veronica persica</i>	Itália	Ripari et al., 2016
	20-25	200	48h	2	1	20	Trigo + Bagas de <i>Myrtus communis</i>	Itália	Ripari et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo (SD. td) (BAL presente em 3 de 7 SD analisados)	Itália	Ripari et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 13 de 13 SD analisados)	França	Lhome et al., 2015
	*	*	*	*	2	*	Arroz (BAL presente em 2 de 2 SD analisados)	França	Lhome et al., 2015



Parâmetros tecnológicos utilizados na produção do *sourdough*

Micro-organismo <sup>a</sup>	T (°C) <sup>b</sup>	RM	RF <sup>d</sup> cada (h)	Far. Rf <sup>e</sup>	SI <sup>f</sup>	TF <sup>g</sup> (dias)	Tipo de farinha	País	Referência(s)
<i>L. spicheri</i> <i>L. viridescens</i>	*	*	*	*	2	*	Trigo+ Arroz (BAL presente em 1 de 1 SD analisados)	França	Lhome et al., 2015
	30	160-350	24h	2	2	10	Trigo e vegetais (grão-bico; lentilha e feijão)	Itália	Rizello et al., 2014
	30	160-350	24h	2	2	10	Trigo e vegetais (grão-bico; lentilha e feijão)	Itália	Rizello et al., 2014
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 16 de 18 SD analisados)	Itália	Lattanzi et al., 2013
	23-25	150-250	3-13h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 4 de 5 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2012
	28	150-250	4h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. aestivum</i> )	Itália	Minervini et al., 2012
	*	*	*	*	2	*	Trigo (SD td) (BAL presente em 1 de 7 SD analisados)	Itália	Ripari et al., 2016
	20-23	Nd	24h	1	2	7	Mistura de Farinhas (Farinha integral, milho, sorgo, Trigo, milheto, teff, centeio e malte)	Etiópia	Abegaz, 2014
	*	*	*	*	2	*	Trigo – SD FB (BAL presente em 1 de 6 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo – SD Ind. (BAL presente em 1 de 5 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
<i>Ln. citreum</i>	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 1 de 13 SD analisados)	França	Lhome et al., 2015
	*	*	*	*	2	*	Trigo – SD Ind. (BAL presente em 1 de 5 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
	30	400	24h	1	1	12	Trigo (SD com pH mínimo=4.0)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	17-22	200	17h	1	2	10	Centeio (SD Padaria)	Bélgica	Harth et al., 2016
	25	160	8h	1	2	3	Trigo (BAL presente em 2 de 8 SD analisados)	Irã	Pontonio et al., 2015
	18	357	24h	1	1	13	Farelo de Trigo	Itália	Manini et al., 2014
	25	160	8h	1	2	3	Trigo ( <i>t. aestivum</i> )(BAL presente em 3 de 6 SD analisados)	Albânia	Nionelli et al., 2014
	25	160	8h	1	2	3	Trigo ( <i>t. durum</i> )	Albânia	Nionelli et al., 2014
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 1 de 18 SD analisados)	Itália	Lattanzi et al., 2013
	24-25	150-250	3-13h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 4 de 5 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2012
<i>Ln. holzapfelli</i>	*	*	*	*	2	*	Trigo (SD td.) (BAL presente em 2 de 7 SD analisados)	Itália	Ripari et al., 2016
	25	200	12h	1	2	10	Trigo mourisco	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
	25	200	12h	1	2	10	Teff	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
<i>Ln. mesenteroides</i>	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 4 de 12 SD analisados)	Turquia	Dertli et al., 2016
	30	400	24h	1	1	10	Trigo (SD com pH sem controle)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	17-22	200	17h	1	2	10	Centeio (Bakery SD)	Bélgica	Harth et al., 2016
	18	357	24h	1	1	13	Farelo de Trigo	Itália	Manini et al., 2014
	30	160-350	24h	2	2	10	Trigo e vegetais (grão-bico; lentilha e feijão)	Itália	Rizello et al., 2014
	25	160	8h	1	2	3	Trigo ( <i>t. aestivum</i> )(BAL presente em 3 de 6 SD analisados)	Albania	Nionelli et al., 2014
	17-22	200	17h	1	2	10	Centeio (SD Padaria)	Bélgica	Harth et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 1 de 18 SD analisados)	Itália	Lattanzi et al., 2013

Parâmetros tecnológicos utilizados na produção do *sourdough*

Micro-organismo <sup>a</sup>	T (°C) <sup>b</sup>	RM <sup>c</sup>	RF <sup>d</sup> cada (h)	Far. Rf <sup>e</sup>	SI <sup>f</sup>	TF <sup>g</sup> (dias)	Tipo de farinha	País	Referência(s)
<i>W. cibaria</i>	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 4 de 12 SD analisados)	Turquia	Dertli et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo (SD td.) (BAL presente em 1 de 7 SD analisados)	Itália	Ripari et al., 2016
	30	400	24h	1	1	10	Trigo (SD com pH sem controle)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	17-22	200	17h	1	2	10	Centeio (SD Padaria)	Bélgica	Harth et al., 2016
	25	160	8h	1	2	3	Trigo (BAL presente em 2 de 8 SD analisados)	Irã	Pontonio et al., 2015
	*	*	*	1	2	*	Trigo (BAL presente em 4 de 4 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2015
	30	160-350	24h	2	2	10	Trigo e vegetais (grão-bico, lentilha e feijão)	Itália	Rizello et al., 2014
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 1 de 18 SD analisados)	Itália	Lattanzi et al., 2013
	23-25	150-250	3-13h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 2 de 5 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2012
	25	200	12h	1	2	10	Trigo mourisco	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
	30	400	24h	1	1	10	Centeio (SD Laboratório)	Bélgica	Harth et al., 2016
	17-22	200	17h	1	2	10	Centeio (SD Padaria)	Bélgica	Harth et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo –SD Ind. (BAL presente em 1 de 5 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
<i>W. confusa</i>	25	160	8h	1	2	3	Trigo	Irã	Pontonio et al., 2015
	20-23	Nd	24h	1	2	7	(BAL presente em 2 de 8 SD analisados)	Etiópia	Abegaz, 2014
							Mistura de Farinhas (Farinha integral, milho, sorgo, Trigo, milheto, teff, centeio e malte)		
<b>BAL Heterofermentativa Facultativa</b>									
<i>L. casei</i>	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 1 de 18 SD analisados)	Itália	Lattanzi et al., 2013
	23-25	150-250	3-13h	1	2	20-80	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 1 de 5 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2012
<i>L. curvatus</i>	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 2 de 11 SD analisados)	Itália	Reale et al., 2010
	*	*	*	*	2	*	Trigo –SD At. (BAL presente em 1 de 5 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo –SD Ind (BAL presente em 1 de 5 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
	30	400	24h	1	1	10	Trigo (SD sem controle de pH)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 2 de 5 SD analisados)	Turquia	Dertli et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 1 de 13 SD analisados)	Itália	Ventimiglia et al., 2015
	*	*	*	1	2	*	Trigo (BAL presente em 1 de 4 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2015
	18	357	24h	1	1	13	Farelo de Trigo	Itália	Manini et al., 2014
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 2 de 18 SD analisados)	Itália	Lattanzi et al., 2013
	23-25	150-250	3-13h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 2 de 5 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2012
<i>L. graminis</i>	20-25	200	48h	2	1	20	Trigo +flores de <i>Senapis alba</i>	Itália	Ripari et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo (SD td. (BAL presente em 1 de 7 SD analisado	Itália	Ripari et al., 2016

Parâmetros tecnológicos utilizados na produção do <i>sourdough</i>									
Micro-organismo <sup>a</sup>	T (°C) <sup>b</sup>	DY <sup>c</sup>	RF <sup>d</sup> cada (h)	Far. Rf <sup>e</sup>	SI <sup>f</sup>	TF <sup>g</sup> (days)	Tipo de farinha	País	Referência(s)
<i>L. paralimentarius</i> <i>L. paracasei</i>	25	200	12h	1	2	10	Trigo saraceno	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
	*	*	*	*	2	*	Trigo - SD FB (BAL presente em 1 de 6 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo -SD Ind. (BAL presente em 1 de 5 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
<i>L. paraplantarum</i>	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 1 de 11 SD analisados)	Itália	Reale et al., 2010
	30	160-350	24h	2	2	10	Trigo e vegetais (grão-bico; lentilha e feijão)	Itália	Rizzello et al., 2014
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 4 de 13 SD analisados)	Turquia	Dertli et al., 2016
<i>L. plantarum</i>	30	160	nd	nd	2	21h	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 5 de 19 SD analisados)	Itália	Alfonzo et al., 2016
	30	400	24h	1	1	12	Trigo (SD com pH mínimo=4,0)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	30	400	24h	1	1	10	Centeio (SD Laboratório)	Bélgica	Harth et al., 2016
	17-22	200	17h	1	2	10	Centeio (SD Padaria)	Bélgica	Harth et al., 2016
	30	160	16h	2	2	4	Trigo 80% + Quinoa 20% (Argentina Quinoa)	Itália /	Rizzello et al., 2016
								Argentina	
	20-25	200	48h	2	1	20	Trigo + Fruta <i>Punica granatum</i> (ex-novo SD)	Itália	Ripari et al., 2016
	20-25	200	48h	2	1	20	Trigo +, Flores de <i>Malus domestica</i> (ex-novo SD)	Itália	Ripari et al., 2016
	*	*	8	*	2	*	Trigo (SD td.) (BAL presente em 2 de 7 SD analisados)	Itália	Ripari et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo - SD FB (BAL presente em 3 de 6 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo - SD Ind. (BAL presente em 3 de 5 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo - SD At. (BAL presente em 1 de 5 SD analisados)	França	Michel et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 2 de 13 SD analisados)	Turquia	Dertli et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 12 de 13 SD analisados)	Itália	Ventimiglia et al., 2015
	*	*	*	*	2	*	Trigo ( <i>t. aestivum</i> ) (BAL presente em 1 de 1 SD analisados)	Itália	Ventimiglia et al., 2015
	*	*	*	*	2	*	Flor Tumnia Trigo (BAL presente em 1 de 1 SD analisados)	Itália	Ventimiglia et al., 2015
	*	*	*	*	2	*			
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 3 de 13 SD analisados)	França	Lhome et al., 2015
	18	357	24h	1	1	13	Trigo bran	Itália	Manini et al., 2014
	25	160	8h	1	2	3	Trigo ( <i>t. aestivum</i> ) (BAL presente em 3 de 7 SD analisados)	Albânia	Nionelli et al., 2014
	25	160	8h	1	2	3	Trigo ( <i>t. durum</i> )	Albânia	Nionelli et al., 2014
	30	160-350	24h	2	2	10	Trigo e vegetais (grão-bico; lentilha e feijão)	Itália	Rizzello et al., 2014
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 5 de 18 SD analisados)	Itália	Lattanzi et al., 2013
	24-25	150-250	3-13h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 3 de 5 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2012
	4-28	168	4h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. aestivum</i> )	Itália	Minervini et al., 2012
	25	200	12h	1	2	10	Trigo saraceno	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al. 2011

(continua)

Parâmetros tecnológicos utilizados na produção do *sourdough*

Micro-organismo <sup>a</sup>	T (°C) <sup>b</sup>	RM	RF <sup>d</sup> cada (h)	Far. Rf <sup>e</sup>	SI <sup>f</sup>	TF <sup>g</sup> (dias)	Tipo de farinha	País	Referência(s)
<i>L. pentosus</i>	35	275	24h	1	2	12	Trigo sarraceno	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
<i>L. sakei</i>	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 8 de 11 SD analisados)	Itália	Reale et al., 2010
	*	*	*	*	2	*	Trigo (SD td.) (BAL presente em 1 de 7 SD analisados)	Itália	Ripari et al., 2016
	30	400	24h	1	1	10	Trigo (SD sem controle de pH)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	30	400	24h	1	1	12	Trigo (SD com pH mínimo=4,0)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	18	357	24h	1	1	13	Farelo de Trigo	Itália	Manini et al., 2014
	23-25	150-250	3-13h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 2 de 5 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2012
	25	200	12h	1	2	10	Trigo sarraceno	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
<b>BAL Homofermentativas</b>									
<i>L. amylolyticus</i>	Nd	Nd	24h	1	1	10	Trigo (BAL presente no 1° e 10° dia de fermentação)	França	Vera et al., 2012
<i>L. coryneformis</i>	30	160	nd	nd	2	21h	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 2 de 19 SD analisados)	Itália	Alfonzo et al., 2016
	30	160-350	18h	2	2	10	Trigo e vegetais (grão-bico; lentilha e feijão)	Itália	Rizello et al., 2014
<i>L. crispatus</i>	35	275	24h	1	2	12	Trigo sarraceno	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
<i>L. gallinarum</i>	35	275	24h	1	2	12	Trigo sarraceno	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
	35	275	24h	1	2	13	Teff	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
<i>Lc. garviae</i>	30	160	nd	nd	2	21h	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 5 de 19 SD analisados)	Itália	Alfonzo et al., 2016
<i>Lc. lactis</i>	30	160	nd	nd	2	21h	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 15 de 19 SD analisados)	Itália	Alfonzo et al., 2016
	30	400	24h	1	1	12	Trigo (sourdough com pH mínimo=4,0)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	25	160	8h	1	2	3	Trigo ( <i>t. aestivum</i> ) (BAL presente em 1 de 6 SD analisados)	Albânia	Nionelli et al., 2014
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 1 de 18 SD analisados)	Itália	Lattanzi et al., 2013
	23-25	150-250	3-13h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 2 de 5 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2012
<i>L. vaginalis</i>	35	275	24h	1	2	12	Trigo sarraceno	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
	35	275	24h	1	2	13	Teff	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
<i>P. pentosaceus</i>	30	160	16h	2	2	4	Trigo 80% + Quinoa 20% (Argentina Quinoa)	Itália /	Rizzelo et al., 2016
	30	400	24h	1	1	10	Trigo (SD sem controle de pH)	Argentina	Kerrebroeck et al., 2016
	30	400	24h	1	1	12	Trigo (SD com pH mínimo = 4,0)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	30	400	24h	1	1	10	Centeio (SD Laboratório)	Bélgica	Harth et al., 2016
	17-22	200	17h	1	2	10	Centeio (SD Padaria)	Bélgica	Harth et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo (SD td.) (BAL presente em 4 de 7 SD analisados)	Itália	Ripari et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo – SD Ind (BAL presente em 1 de 5 SD analisados)	França	Michel et al., 2016

(continua)

Parâmetros tecnológicos utilizados na produção do <i>sourdough</i>									
Micro-organismo <sup>a</sup>	T (°C) <sup>b</sup>	RM <sup>c</sup>	RF <sup>d</sup> cada (h)	Far. Rf <sup>e</sup>	SI <sup>f</sup>	TF <sup>g</sup> (dias)	Tipo de farinha	País	Referência(s)
<i>P. acidilactici</i> <b>LEVEDURAS</b> <i>C. glabrata</i> <i>C. humilis</i> ( <i>Syn. C. milleri</i> )	25	160	8h	1	2	3	Trigo (BAL presente em 3 de 8 SD analisados)	Irã	Pontonio et al., 2015
	18	357	24h	1	1	13	Farelo de Trigo	Itália	Manini et al., 2014
	25	160	8h	1	2	3	Trigo ( <i>t. durum</i> )	Itália	Nionelli et al., 2014
	*	*	*	1	2	7	Mistura de Faremhas (Fareinha integral, milho, sorgo, Trigo, milheto, teff, centeio e malte)	Etiópia	Abegaz, 2014
	23-25	150-250	3-13h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (BAL presente em 3 de 5 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2012
	25	200	12h	1	2	10	Trigo sarraceno	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
	25	200	12h	1	2	10	Teff	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
	*	*	*	*	2	*	Trigo (BAL presente em 1 de 18 SD analisados)	Itália	Lattanzi et al., 2013
	30	400	24h	1	1	12	Trigo (SD com pH mínimo=4.0)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	35	275	24h	1	2	13	Teff	Países B.	Moroni et al., 2011
<i>C. santamarye</i> <i>Cb. fabianei</i> <i>K. barnettii</i> <i>K. exigua</i> ( <i>Syn. S. exigus</i> ) <i>K. servazzii</i> ( <i>Syn. S. servazzii</i> ) <i>K. unispora</i>	30	400	24h	1	1	10	Trigo (SD sem controle de pH)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo (Levedura presente em 8 de 18 SD analisados)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	23-25	150-250	3-13h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (Levedura presente em 1 de 5 SD analisados)	Itália	Lattanzi et al., 2013
	30	400	24h	1	1	10	Trigo (SD sem controle de pH)	Itália	Minervini et al., 2012
	30	400	24h	1	1	12	Trigo (SD com pH mínimo=4.0)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	30	400	24h	1	1	10	Trigo (SD sem controle de pH)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	30	400	24h	1	1	12	Trigo (SD com pH mínimo=4.0)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo (SD td.) (Levedura presente em 1 de 7 SD analisados)	Itália	Ripari et al., 2016
	25	200	12h	1	2	10	Trigo sarraceno	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
	30	400	24h	1	1	12	Trigo (SD com pH mínimo=4.0)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
<i>P. kudriavzevii</i> <i>S. bayanus</i>	*	*	*	*	2	*	Trigo (Levedura presente em 2 de 13 SD analisados)	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
	23-25	150-250	3-13h	1	1	20-80	Trigo (SD com pH mínimo=4.0)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	4-24	168	4h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (Levedura presente em 4 de 5 SD analisados)	Itália	Lhome et al., 2015
	30	400	24h	1	1	10	Trigo ( <i>t. aestivum</i> )	Itália	Minervini et al., 2012
	30	400	24h	1	1	12	Trigo (SD sem controle de pH)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	23-25	150-250	3-13h	1	1	20-80	Trigo (SD com pH mínimo=4.0)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (Levedura presente em 3 de 5 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2012
	30	400	24h	1	1	10	Trigo (SD sem controle de pH)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	30	400	24h	1	1	12	Trigo (SD com pH mínimo=4.0)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	23-25	150-250	3-13h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (Levedura presente em 3 de 5 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2012

Parâmetros tecnológicos utilizados na produção do *sourdough*

Micro-organismo <sup>a</sup>	T <sup>b</sup> (°C)	RM <sup>c</sup>	RF <sup>d</sup> cada (h)	Far. Rf <sup>e</sup>	SI <sup>f</sup>	TF <sup>g</sup> (dias)	Tipo de farinha	País	Referência(s)
<i>S. cerevisiae</i>	20-25	200	48h	2	1	20	Trigo + frutas de <i>Punica granatum</i>	Itália	Ripari et al., 2016
	20-25	200	48h	2	1	20	Trigo + flores de <i>Senapis alba</i>	Itália	Ripari et al., 2016
	20-25	200	48h	2	1	20	Trigo + flores de <i>Malus domestica</i>	Itália	Ripari et al., 2016
	20-25	200	48h	2	1	20	Trigo + flores de <i>Veronica persica</i>	Itália	Ripari et al., 2016
	20-25	200	48h	2	1	20	Trigo + Bagas de <i>Myrtus communis</i>	Itália	Ripari et al., 2016
	20-25	200	48h	2	1	20	Trigo + vinagre mãe	Itália	Ripari et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo (SD td.) (Levedura presente em 7 de 7 SD analisados)	Itália	Ripari et al., 2016
	*	*	*	*	2	*	Trigo (Levedura presente em 12 de 13 SD analisados)	França	Lhome et al., 2015
	*	*	*	*	2	*	Arroz (Levedura presente em 2 de 2 SD analisados)	França	Lhome et al., 2015
	*	*	*	*	2	*	Trigo+ Arroz (Levedura presente em 1 de 1 SD analisados)	França	Lhome et al., 2015
	*	*	*	*	2	*	Teff	Itália	Lattanzi et al., 2013
	23-25	150-250	3-13h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. durum</i> ) (Levedura presente em 5 de 5 SD analisados)	Itália	Minervini et al., 2012
	4-24	168	4h	1	1	20-80	Trigo ( <i>t. aestivum</i> )	Itália	Minervini et al., 2012
	25	200	12h	1	2	10	Trigo (Levedura presente em 15 de 18 SD analisados)	Países B. <sup>h</sup>	Moroni et al., 2011
<i>W. anomalous</i> (Sin. <i>P. anomala</i> )	*	*	*	*	2	*	Trigo (SD td.) (Levedura presente em 1 de 7 SD analisados)	Itália	Ripari et al., 2016
	30	400	24h	1	1	10	Trigo (SD sem controle de pH)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016
	30	400	24h	1	1	12	Trigo (SD com pH mínimo=4.0)	Bélgica	Kerrebroeck et al., 2016

<sup>a</sup> BAL: L= *Lactobacillus*; Lc= *Lactococcus*; Ln= *Leuconostoc*; W= *Weissella*; Leveduras = Cb: *Cyberlindera*; K= *Kazachstania*; P= *Pichia*, W= *Wickerhamomyces*;

<sup>b</sup> T = Temperatura de Fermentação;

<sup>c</sup> RM = Rendimento da massa;

<sup>d</sup> Rf = *Refreshment* / alimentação (intervalo em horas entre cada *refreshment*);

<sup>e</sup> Farinha utilizada no(s) *refreshments* (1 = mesma farinha do início do processo; 2 = farinha diferente no início e nos *refreshments*, *refreshments* com farinha de trigo);

<sup>f</sup> AI: Amostra utilizada para análise de isolamento (1 = Micro-organismo encontrado nas amostras de *refreshment*; 2 = Micro-organismo encontrado nas amostras do final dos *refreshments*;

<sup>g</sup> Tempo total de fermentação;

<sup>h</sup> Países Baixos

\* Isolamento realizado em *sourdough* produzidos em padarias artesanais sem informações referentes ao processo de produção

SD = *Sourdough*; Td. = tradicional; Ind = industrial; FB = *Farmer-Baker*; At = artesanal; nd = não informado

A microbiota do *sourdough* é influenciada pelos parâmetros do processo (por exemplo, temperatura e teor de água), fatores endógenos, como: tipo e qualidade (enzimática, microbiológica, nutricional e textura) da farinha de cereais utilizada e pela interação entre BALs, leveduras e outras bactérias presentes na farinha (GOBBETTI, 1998; MEROTH *et al.*, 2003).

As BALs encontradas nos *sourdoughs* podem interagir de forma sinérgica ou antagônica entre si, devido a interações no metabolismo de hidrocarbonetos, fontes de nitrogênio e a produção de compostos que estimulam ou inibem o crescimento das outras espécies (DE VUYST *et al.*, 2009). No início do processo fermentativo, os carboidratos mais abundantes encontrados no meio são o amido - que é hidrolisado em dextrinas, maltodextrinas, maltotrioses, os quais pela ação das enzimas amilases ( $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e glucoamilases) presentes na farinha de trigo e de centeio e a sacarose são convertidos em maltose, monômeros e glicose (STOLZ *et al.*, 1993; AXELSSON, 1999; BRANDT, 2007; BELITZ *et al.*, 2008). Um exemplo de interação sinérgica é observada por meio da hidrólise da maltose (não envolvendo consumo de ATP) pela *L. sanfranciscensis*, liberando glicose, que por sua vez é consumida pelas leveduras como *C. humilis* que não podem degradar a maltose (GOBBETT *et al.*, 1995; STOLZ *et al.*, 1995; GOBBETTI e CORSETTI, 1997). A sacarose é hidrolisada pela ação das enzimas invertase presentes na farinha de trigo e também produzidas por *S. cerevisiae*, liberando glicose e frutose, que servem como nutrientes para as BALs e leveduras maltose negativas (GOBBETTI *et al.*, 1994; DE VUYST e NEYSENS, 2005). Com o crescimento da BAL, são produzidos ácido láctico e acético, reduzindo o pH e favorecendo a atividade das proteases presentes nas farinhas de centeio e de trigo (BRIJS *et al.*, 1999). Isso resulta na liberação de compostos alifáticos, ácidos dicarboxílicos e hidroxí-aminoácidos, a maioria dos quais são utilizados no desenvolvimento de leveduras (GOBBETT *et al.*, 1995). Além disso, como resultado de crescimento ou autólise acelerada, as células de levedura liberam aminoácidos essenciais para o crescimento das BALs (VELASCO *et al.*, 2004; ALEXANDRE e GUILLOUX-BENATIER, 2006).

Como uma interação antagônica, observa-se a competição por maltose entre a *S. cerevisiae* e as BALs heterofermentativas. Esta espécie de levedura



consome os açúcares presentes na farinha a uma taxa maior do que as BALs, reduzindo o metabolismo dessas bactérias (DE VUYST e NEYSENS, 2005).

Devido a estas interações complexas que envolvem o metabolismo do carbono e do nitrogênio, o *sourdough* é considerado um ecossistema microbiano peculiar. Portanto, os parâmetros que afetam o crescimento microbiano não são classificados como endógenos ou exógenos. Mas são classificados em parâmetros tecnológicos (por exemplo, porcentagem de fermento utilizado como inóculo, pH, temperatura de fermentação, teor de minerais presentes na farinha, etc.) ou em parâmetros que não são inteiramente controlados, como microbiota autóctone na farinha utilizada, característica dos produtos de cereais utilizados, dispersão ou deriva de contaminantes (GÄNZLE e RIPARI, 2016). Todos esses parâmetros e suas combinações são responsáveis pela variedade da microbiota encontrada em uma determinada amostra de *sourdough* (DE VUYST e NEYSENS, 2005; MINERVINI *et al.*, 2015).

A concentração ideal de *sourdough* utilizado como inóculo para as propagações no *sourdough* tipo I é de 10 a 40%. Com o aumento da concentração do inóculo, o pH diminui, resultando em uma seleção microbiana (a espécie que retém a viabilidade celular no final da fermentação). Concentrações abaixo de 2% favorecem o crescimento de *L. sanfranciscensis*; por outro lado, concentrações superiores a 50% inibem o crescimento de lactobacilos, mas não de leveduras, provavelmente devido ao menor pH (BRANDT *et al.*, 2004). Por outro lado, devido a maior concentração de minerais como ferro, sódio, potássio, magnésio e fósforo, estes atuam como um agente tamponante, devido à maior concentração de minerais, como ferro, sódio, potássio, magnésio e fósforo, permitindo às BALs fermentarem a massa sem serem suprimidas, resultando em maior acidez em um menor tempo de fermentação (SALOVAARA e VALJAKKA, 1987).

### 1.3 BENEFÍCIOS DO USO DE SOURDOUGH

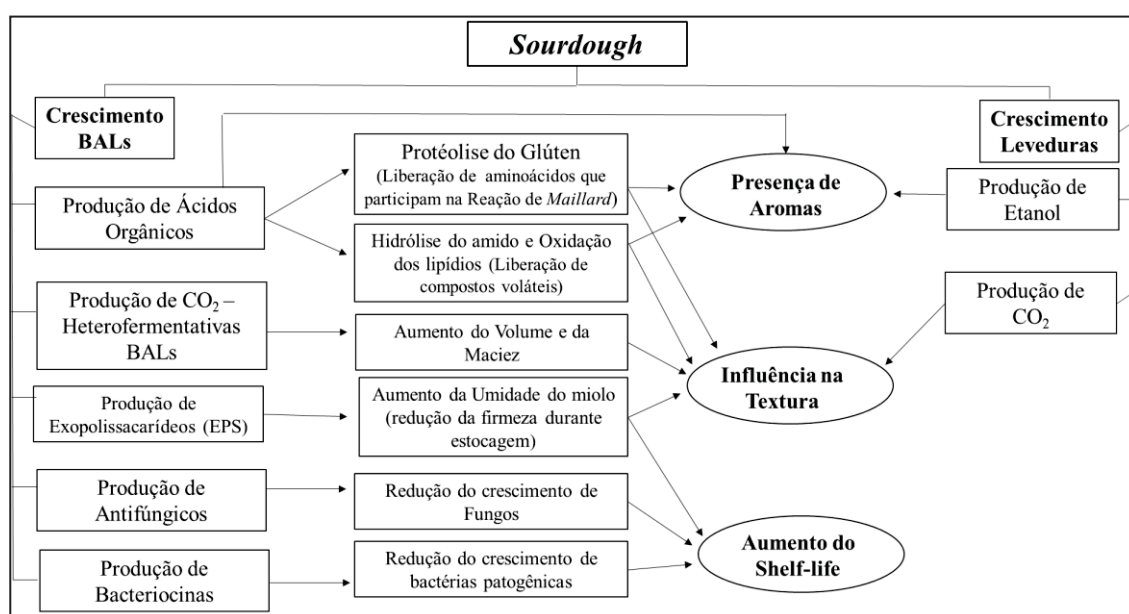
Devido à fermentação associativa entre BALs e leveduras, o amido é hidrolisado, a acidez da massa aumenta e o glúten é degradado, contribuindo



para melhorar a textura, estrutura e a concentração de compostos voláteis da massa.

Na Figura 2 são apresentadas as principais modificações do *sourdough* que influenciam na qualidade dos produtos de panificação em termos de textura, presença de aromas (perfil volátil), aumento da vida útil, valor nutricional e digestibilidade.

FIGURA 2 – PRINCIPAIS ALTERAÇÕES QUE OCORREM NA MASSA E QUE INFLUENCIAM DIRETAMENTE NA TEXTURA, PRESENÇA DE AROMAS E NO AUMENTO DO *SHELF-LIFE*



BALs = bactérias do ácido láctico

### 1.3.1 Textura

A textura é uma das características sensoriais mais importantes nos produtos alimentícios. A substância responsável por esta característica nos produtos de panificação é o glúten, uma proteína complexa composta por proteínas de gliadina e glutenina. As proteínas gliadinas são responsáveis pela viscosidade da massa e são solúveis em álcool, enquanto as gluteninas contribuem para a força e elasticidade e são solúveis em ácidos (OSBORNE, 1907; GÄNZLE, M.G. *et al.*, 2007).

No *sourdough*, ocorre a proteólise do glúten e a hidrólise moderada do amido devido à produção de ácido acético e ácido lático pelas BALs, com consequente redução do pH (CORSETTI *et al.*, 1998). A presença de um meio mais ácido causa o intumescimento e maior solubilidade das proteínas de glúten. O aumento das forças intramoleculares provoca o desdobramento da proteína, resultando em maior exposição da parte hidrofóbica. Consequentemente, o grande agregado de proteína sofre proteólise, gerando uma emulsão mais estável e menos elástica que possui maior extensibilidade. As propriedades reológicas da massa final dependem da concentração de *sourdough* utilizado como agente de fermentação e na extensão do glúten durante a fermentação (HOSENEY, 1994; CORSETTI *et al.*, 2001; TAKEDA *et al.*, 2001; CLARKE *et al.*, 2004). No entanto, a proteólise é limitada, permitindo uma maior retenção de CO<sub>2</sub> e influenciando diretamente no volume e maciez do produto final (THIELE *et al.*, 2002).

Além das alterações no glúten, algumas bactérias ácido-lático produzem exopolissacarídeos (EPS), polímeros de carboidratos de alta massa molecular, como o dextrano, que ajudam a melhorar o volume do pão e reduzem a firmeza. O dextrano atua como um substituto do glúten se ligando a água da massa (WOLTER *et al.*, 2014). Di Cagno *et al.* (2006) observaram que o *sourdough* fermentado com *W. cibaria* e *L. plantarum* que produzem EPS apresentou aumento de 20% no volume específico e menor firmeza. Chen *et al.* (2016) comparou a adição do dextrano, produzida pela *W. cibaria* com adição do *reuteran* produzido pela *L. reuteri*. O dextrano teve o melhor resultado, melhorando o volume e a textura do pão de trigo e do pão com 20 % de farinha de centeio.

### 1.3.2 Presença de Aromas

Entre as características sensoriais dos produtos alimentares, o aroma tem um papel importante na aceitação pelos consumidores (PARASKEVOPOULOU *et al.*, 2012). O aroma do *sourdough* e dos outros produtos de panificação é resultado dos compostos voláteis gerados na proteólise do glúten e nas etapas realizadas durante o processamento e no tratamento térmico (HEINIÖ *et al.*, 2003). Os compostos voláteis produzidos no

*sourdough* podem ser divididos em duas categorias: (i) compostos não voláteis, como os ácidos orgânicos produzidos pelas BALs (GOBBETT *et al.*, 1995); e (ii) compostos voláteis, tais como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e enxofre (SPICHER, 1983).

Na Tabela 2 são apresentados os compostos voláteis identificados em *sourdoughs* e pães com seus respectivos odores. Compostos das classes químicas: álcoois, aldeídos e ácidos; representam o aroma do *sourdough*. O etanol, o 1-hexanol, o 1-pentanol e o álcool isoamílico são compostos voláteis da classe química alcoólica e são responsáveis pelo odor de álcool, ervas, balsâmico e alcoólicas e malte, respectivamente. Ripari *et al.* (2016) analisaram o perfil de compostos voláteis de diferentes *sourdoughs* e avaliaram resultados como a soma dos picos da área de todos os compostos voláteis encontrados. Os álcoois são responsáveis por quase 30% da área (0,80-22,86% para o etanol; 0,39-27,61% para 1-hexanol; 0,05-4,95% para 1-pentanol). No pão feito com *sourdough* Corona *et al.* (2016) observaram que o etanol, 1-hexanol, 1-pentanol e álcool isoamílico representam respectivamente 1,18-26,61%; 10,41-1,76%; 0,11-0,42% e 2-25-11,19% da área total do pico de todos os compostos voláteis encontrados. As concentrações destes compostos variam de acordo com a cultura inicial, o substrato, a temperatura de fermentação e a temperatura de assamento utilizadas no processo.

TABELA 2 – PRINCIPAIS COMPOSTOS VOLÁTEIS ENCONTRADOS EM SOURDOUGH TIPO II E PÃES, COM SUAS RESPECTIVAS CARACTERÍSTICAS DE ODOR

(continua)

Composto	Tipo do Odor	Faixa de concentração $\mu\text{g g}^{-1*}$ Álcool	Referências
Etanol	Alcoólico	0,00-15,70	Ruiz <i>et al.</i> 2003; Plessas <i>et al.</i> 2008; Poinot <i>et al.</i> 2008; Aponte <i>et al.</i> 2013; Ripari <i>et al.</i> 2016; Corona <i>et al.</i> 2016
Álcool isobutílico	Alcoólico	0,00-5,75	Ruiz <i>et al.</i> 2003; Plessas <i>et al.</i> 2008; Aponte <i>et al.</i> 2013
1-hexanol	Ervas	0,00-1,04	Ruiz <i>et al.</i> 2003; Guerzoni <i>et al.</i> 2007; Plessas <i>et al.</i> 2008; Poinot <i>et al.</i> 2008; Kim <i>et al.</i> 2009; Aponte <i>et al.</i> 2013; Ripari <i>et al.</i> 2016; Corona <i>et al.</i> 2016
1-octanol	Frutas	0,01-0,71	Ruiz <i>et al.</i> 2003; Plessas <i>et al.</i> 2008; Aponte <i>et al.</i> 2013; Ripari <i>et al.</i> 2016

(continua)			
1-nonanol	Floral	-	Ruiz et al. 2003; Kim et al. 2009; Ripari et al. 2016
Composto	Tipo do Odor	Faixa de concentração $\mu\text{g g}^{-1*}$	Referências
1-pentanol	Fermentado	0,05-0,37 <sup>2</sup>	Ruiz et al. 2003; Poinot et al. 2008; Kim et al. 2009; Aponte et al. 2013; Ripari et al. 2016; Corona et al. 2016
Feniletil álcool	Floral	0,00-0,30 <sup>1</sup>	Poinot et al. 2008; Plessas et al. 2008; Kim et al. 2009; Ripari et al. 2016; Corona et al. 2016
1-octen-3-ol	Terra	-	Ruiz et al. 2003; Guerzoni et al. 2007; Poinot et al. 2008; Kim et al. 2009; Ripari et al. 2016
1-heptanol	Verde	-	Ruiz et al. 2003; Guerzoni et al. 2007; Kim et al. 2009; Ripari et al. 2016
3-Metil-1-butanol (isoamil álcool)	Balsâmico, alcoólico, malte	0,03-38,83 <sup>2</sup>	Ruiz et al. 2003; Guerzoni et al. 2007; Poinot et al. 2008; Kim et al. 2009; Aponte et al. 2013; Corona et al. 2016
<b>Esteres</b>			
Etil acetate	Etér	0,00-23,35	Guerzoni et al. 2007; Plessas et al. 2008; Poinot et al. 2008; Aponte et al. 2013; Ripari et al. 2016
Etil lactato	Frutado	0,01-1,72 <sup>2</sup>	Ruiz et al. 2003; Aponte et al. 2013; Ripari et al. 2016; Corona et al. 2016;
Octanoato de etila	Doce, sabão, fresco e frutados	0,00-0,44 <sup>2</sup>	Ruiz et al. 2003; Aponte et al. 2013; Corona et al. 2016
<b>Alcanos</b>			
Decane	Alcanos	-	Ruiz et al. 2003; Corona et al. 2016;
Limonene	Citrus	0,00-0,32 <sup>2</sup>	Ruiz et al. 2003; Aponte et al. 2013; Corona et al. 2016
<b>Aldeídos</b>			
Acetaldeído	Frutado	0,00-0,49	Plessas et al. 2008; Aponte et al. 2013; Ripari et al. 2016
Hexanal	Verde	0,00-0,14	Ruiz et al. 2003; Guerzoni et al. 2007; Plessas et al. 2008; Poinot et al. 2008; Kim et al. 2009; Aponte et al. 2013; Ripari et al. 2016; Corona et al. 2016
Heptanal	Gorduroso, ranço, citrus, malte	0,00-0,03	Guerzoni et al. 2007; Plessas et al. 2008; Kim et al. 2009; Aponte et al. 2013
2-heptenal	Frutado	-	Ruiz et al. 2003; Kim et al. 2009; Ripari et al. 2016; Corona et al. 2016
Nonanal	Aldeídico	0,00-1,27	Ruiz et al. 2003; Guerzoni et al. 2007; Plessas et al. 2008; Kim et al. 2009; Aponte et al. 2013; Ripari et al. 2016; Corona et al. 2016
Decanal	Aldeídico	-	Kim et al. 2009; Ripari et al. 2016; Corona et al. 2016
2-nonenal	Gorduroso	0,00-0,34 <sup>1</sup>	Ruiz et al. 2003; Plessas et al. 2008; Corona et al. 2016

2-octenal	Gorduroso	-	Ruiz et al. 2003; Kim et al. 2009 Ripari et al. 2016; Corona et al. 2016
conclusão			
Composto	Tipo do Odor	Faixa de concentração $\mu\text{g g}^{-1}$ *	Referências
Octanal	Aldeídico	-	Ruiz et al. 2003; Guerzoni et al. 2007 Kim et al. 2009; Ripari et al. 2016 Corona et al. 2016
<b>Ácidos</b>			
Ácido láctico	Odor pouco desagradável	0,00-0,03	Guerzoni et al. 2007; Plessas et al. 2008;
Ácido acético	Ácido, pungente	0,00-3,20	Ruiz et al. 2003; Guerzoni et al. 2007 Plessas et al. 2008; Poinot et al. 2008 Kim et al. 2009; Aponte et al. 2013 Ripari et al. 2016; Corona et al. 2016
Ácido butanóico	Queijo e Ranço	-	Ruiz et al. 2003; Guerzoni et al. 2007 Poinot et al. 2008; Kim et al. 2009 Ripari et al. 2016
Ácido hexanóico	Gorduroso	0,00-0,02	Ruiz et al. 2003; Guerzoni et al. 2007 Plessas et al. 2008; Poinot et al. 2008 Kim et al. 2009; Ripari et al. 2016 Corona et al. 2016
Ácido heptanóico	Queijo, gorduroso, suor	-	Ruiz et al. 2003; Guerzoni et al. 2007 Kim et al. 2009
Ácido octanóico	Queijo, gorduroso, suor, sabão	-	Ruiz et al. 2003; Plessas et al. 2008; Kim et al. 2009
Ácido isobutírico	Suave, manteiga, gorduroso, azedo, ranço	-	Ruiz et al. 2003; Guerzoni et al. 2007 Poinot et al. 2008
Ácido isolavérico	Queijo	-	Ruiz et al. 2003; Guerzoni et al. 2007 Poinot et al. 2008
<b>Cetonas</b>			
2,3butanedione	Manteiga, caramelo	0,00-0,82 <sup>2</sup>	Ruiz et al. 2003; Poinot et al. 2008 Aponte et al. 2013
3-Hidroxi-2-butanone (acetoína)	Caramelo, manteiga, iogurte, creme	0,02-1,41	Ruiz et al. 2003; Poinot et al. 2008 Aponte et al. 2013; Ripari et al. 2016 Corona et al. 2016
<b>Compostos Heterocíclicas</b>			
Furfural	Amêndoa, pão, solo, queimado, doce, torrado	0,00-0,19	Ruiz et al. 2003; Plessas et al. 2008; Poinot et al. 2008; Aponte et al. 2013
2-pentilfurane	Manteiga, feijão verde, floral, frutado, cogumelo, nozes cruas	-	Ruiz et al. 2003; Poinot et al. 2008 Kim et al. 2009

\*Faixa de concentração avaliada por Plessas et al. (2008) e Aponte et al. (2013), as demais referências não realizaram determinação da concentração.

<sup>1</sup>Faixa de concentração encontrada por Plessas et al. (2008)

<sup>2</sup> Faixa de concentração encontrada por Aponte et al. (2013)

Os aldeídos representam o aroma do miolo do pão e são gerados durante a oxidação dos lipídios na farinha e pela atividade das enzimas lipoxigenase e hidroperoxidases-liases que ocorrem naturalmente no endosperma do trigo (BIRCH *et al.*, 2014). Na Tabela 2 é observado que o hexanal, o benzaldeído e o nonanal são os aldeídos presentes na maioria dos *sourdoughs* avaliados. De acordo com Kim *et al.* (2009) os aldeídos, benzaldeído e o hexanal, representam o aroma do pão de trigo sem *sourdough* (NWSB). Já, o nonanal representa o aroma do pão com 20% de *sourdough* de trigo (WSB) (os resultados em porcentagem média de área de cada composto identificado): benzaldeído WSB = 0,79 e NWSB = 0,92; WSB hexanal = 10,21 e NWSB = 10,61; WSB nonanal = 14,60 e NWSB = 11,34). Comparando esses resultados com as características de odor de cada composto (Tabela 2), o NWSB mostrou aroma mais aldeídico e WSB os aromas frutado.

O tipo de amido e proteína presente na farinha também influencia o aroma do *sourdough* (SALOVAARA e VALJAKKA, 1987), bem como a microbiota presente durante a fermentação (HANSEN e SCHIEBERLE, 2005; PLESSAS *et al.*, 2008). Makhoul *et al.* (2015) realizaram um estudo revelando que a utilização de diferentes cepas de *S. cerevisiae* teve maior influência no perfil final dos compostos aromáticos do pão, do que o uso de diferentes tipos de farinha.

Portanto, é claro que a microbiota do *sourdough* produz voláteis ou precursores de compostos voláteis que podem afetar positivamente as características sensoriais do produto final. Ripari *et al.* (2016) analisaram o perfil volátil do *sourdough* modelo fermentado por uma única cepa (*L. crustorum*, *L. plantarum*, *L. spicheri*, *Lc. holzapelli*, *W. confusa*, *Acetobacter cerevisiae* e *S. cerevisiae*) para investigar os compostos voláteis produzidos a partir de diferentes cepas bacterianas em comparação com a massa com levedura. Usando apenas leveduras, o aroma é caracterizado por poucos compostos. Considerando uma parte dos compostos voláteis detectados, o estudo revela que, na massa inoculada com a *L. crustorum* homofermentativo, o etanol e o acetato de etila estão ausentes, bem como os ésteres, e, como esperado, aparecem diacetil e muitos outros compostos de carbonila. Nos casos analisados com BALs heterofermentativas e heterofermentativas

facultativas, o etanol e o acetato de etila estão sempre presentes, mas em uma quantidade diferente. Entre as BAL testadas, a *L. plantarum* forneceu o perfil volátil mais rico. No *sourdough*, os compostos aromatizantes são produzidos pelas leveduras e BALs, e estes compostos são produzidos de forma específica por determinada cepa. Além disso, o pão com *sourdough* atinge uma maior pontuação em testes sensoriais e possui maior conteúdo de voláteis em comparação com pão acidificado quimicamente (usando ácidos láctico e acético). Demonstrando que não só a acidificação da massa é responsável pela melhoria dos compostos voláteis (HANSEN e SCHIEBERLE, 2005) .

Quando os produtos de panificação são produzidos com farinha rica em ácidos fenólicos, como as farinhas integrais, as BALs e leveduras podem reduzir ou descarboxilar os ácidos fenólicos. Algumas cepas de BALs são capazes de descarboxilar e/ou reduzir os ácidos fenólicos de uma forma específica (DE LAS RIVAS *et al.*, 2009). A presença de ácido fenólico volátil, principalmente de vinil e/ou derivados de etila, levam ao contrário do vinho, a uma maior apreciação dos consumidores. Além disso, a presença de ácido fenólico livre a partir de ácidos fenólicos aumenta a biodisponibilidade de fenólicos como antioxidantes (WANG *et al.*, 2014), e a degradação de ácidos fenólicos também é relevante por causa da eliminação do sabor amargo (GÄNZLE, 2014) .

Durante o processo de assamento, a reação mais importante envolvendo a crosta é a reação não enzimática conhecida como reação de *Maillard* (PURLIS e SALVADORI, 2009). No *sourdough*, a reação de *Maillard* é influenciada pela proteólise do glúten que resulta na liberação de aminoácidos que, por sua vez, reagem com a glicose e com os açúcares redutores durante o assamento e iniciam a reação de *Maillard* (BARBER *et al.*, 1992; GOBBETT *et al.*, 1995). A adição de enzimas como, amilases e glucosidades durante a fermentação aumenta a concentração de açúcar redutores na massa, favorecendo a reação de *Maillard* (GUINET e GODON, 1996). Outros fatores que influenciaram a concentração dos compostos de *Maillard* são: temperatura e umidade durante o assamento; e o baixo pH do *sourdough* (KAMINSKI *et al.*, 1981). Temperaturas de assamento acima de 220 ° C aceleram a reação, e o



vapor de água favorece a dextrinização do amido, liberando açúcares (GUINET e GODON, 1996).

Além da reação de *Maillard*, durante o assamento do pão (temperatura acima de 150 °C na crosta) ocorre também a caramelização do açúcar, liberando compostos voláteis (HADIYNTTO *et al.*, 2007; BIANCHI *et al.*, 2008) e evaporando parte dos compostos de baixa massa molar formados durante a fermentação, como etanol, ésteres (acetato de etila e 3-metilbutanoato de etila) e ácidos (BIRCH *et al.*, 2014).

A produção de quantidades suficientes de compostos voláteis durante a fermentação ocorre em várias etapas durante um período de 12-24 h. Os compostos como: etanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, n-propanol, 2-feniletanol, álcool benzílico, ácido 2-metilpropanóico, ácido 3-metilbutanóico ou ácido acético encontram-se em maior concentração em pão com a adição de *sourdough* do que no pão convencional. Outros compostos como: metilpropanol, acetato de etila e lactato de etila, bem como aldeídos tais como 2-metilpropanol, 2 e 3 metilbutanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol e nonanal, também são encontrados em maiores concentrações em *sourdough* (SEITZ *et al.*, 1998). De acordo com a Tabela 2, esses compostos são responsáveis por odor alcoólico, frutado, malte e ácido, garantindo um aroma mais intenso em pão com *sourdough* que no pão tradicional.

Na caracterização dos aromas de pães produzidos com 20% de *sourdough*, realizada por Kim *et al.* (2009), foram identificados 53 compostos diferentes, dos quais o etanol e o 3-metil-1-butanol apareceram em maiores concentrações, esses compostos são típicos da fermentação do *sourdough*. Aponte *et al.* (2013) identificaram 59 compostos voláteis presentes em *sourdough* de castanha - 16 álcoois, 13 ésteres, 8 aldeídos, 6 cetonas e, entre outros, como ácidos, furanos, pirazinas, fenol, terpenos, lactonas e alcanos. Usando o *sourdough*, um aroma específico é conferido ao miolo do pão (PÉTEL *et al.*, 2017).

### 1.3.3 Aumento da vida de prateleira

Um processo químico e físico que ocorre durante o armazenamento, conhecido como "endurecimento" do pão, provoca a perda da suavidade do



pão, do aroma de fresco e da crocância da crosta. Embora este mecanismo ainda não tenha sido totalmente compreendido, as principais causas dessas alterações são a retrogradação da amilopectina, a interação entre as moléculas de amido e proteínas de glúten e a redistribuição da água no produto (GOESAERT *et al.*, 2009; FADDA *et al.*, 2014) todos os quais são responsáveis pelo endurecimento do produto.

O *sourdough* tem uma crosta mais grossa do que o pão fermentado apenas com leveduras, dificultando a evaporação da água presente no miolo do pão, e ajudando a manter a maciez. Além disso, a atividade das BALs no *sourdough* também aumentam a vida útil em relação aos produtos fermentados usando apenas leveduras. As BALs produzem inúmeros metabólitos que possuem efeitos positivos na textura, firmeza e preservação de produtos de panificação, entre os quais estão os ácidos orgânicos, exopolissacarídeos (EPS), enzimas, compostos bactericidas e antimicrobianos.

A diminuição do endurecimento ao longo da vida de prateleira observada no *sourdough* é resultado também da atividade dos EPS produzidos pelas BALs. O EPS se liga à água disponível no pão, deixando menos água livre para migrar para a crosta do produto (TIEKING e GÄNZLE, 2005; POUTANEN *et al.*, 2009). No *sourdough* de trigo integral, além do EPS, a adição de enzimas como xilanase e endoxilanase é muito influente no prolongamento da vida útil. A xilanase é responsável por quebrar os polissacarídeos presentes na hemicelulose dos grãos inteiros, liberando assim cadeias menores de carboidratos que se ligam à água, aumentando a suavidade do produto. Além disso, também se observa uma redução na retrogradação da amilopectina como resultado da atividade dessas enzimas (KTENIOUDAKI *et al.*, 2015). Ktenioudaki *et al.* (2015) verificaram que a adição da enzima xilanase melhorou o volume específico e a textura do pão feito com bagaço de malte com e sem *sourdough*. Corsetti *et al.* (2000) observaram que a adição da enzima endoxilanase diminuiu a firmeza do pão de trigo fermentado com *sourdough*.

Juntamente com o endurecimento, o crescimento de fungos também é responsável por reduzir a vida útil dos produtos de panificação (GRAY e BEMILLER, 2003). Neste caso, a perda econômica pode ser associada à possível produção de aflatoxinas e também a problemas de saúde (Sadeghi,

2008). De acordo com Axel et al. (2016), Cortés-Zavaleta et al. (2014), Crowley et al. (2013), Black et al. (2013), Dalié et al. (2010) e Shnürer e Magnusson (2005), as BALs podem produzir compostos antifúngicos: ácido láctico e acético, dióxido de carbono, diacetil, peróxido de hidrogênio, ácido caprótico, ácidos graxos 3-hidroxi, ácido fenilacético, dipeptídeos cíclicos, reuterina e fungicidas. Esses dados são confirmados por Rizzello et al. (2011), que verificaram que os ácidos láctico, acético e valérico presentes no *sourdough* atuam como antifúngicos, preservando o produto embalado por até 28 dias. Resultados semelhantes foram obtidos em um produto controle ao qual foi adicionado propionato de cálcio a 0,3% (m/v), um conservante comum usado em pães. Este é um exemplo de como o *sourdough* pode ser produzido sem a adição de conservantes (DENKOVA et al., 2014).

Lavermicocca et al. (2000) identificaram em *sourdough* fermentado com *L. plantarum* a presença de novos compostos antifúngicos, ácido fenilactico e ácido 4-hidroxi-fenilacético, que inibiram o crescimento de *Fusarium graminearum*. Magnusson e Schurer (2001) verificaram que *L. coryniformis* subs. *coryniformis* é um maior produtor de compostos antifúngicos a pH 3,0 e 4,5 e na fase estacionária de crescimento, porém um declínio na produção deste composto foi observado após 48h de cultivo. Estes compostos também foram eficazes contra o crescimento de *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *Penicillium roqueforti*, *Mucor hiemalis*, *Talaromyces flavus*, *Fusarium poae*, *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. sporotrichoides*. Além disso, *L. plantarum*, *P. pentosaceus* e *L. rhamnosus* também demonstraram uma forte atividade contra *Aspergillus oryzae* ATCC 66222, enquanto a *L. brevis* e *Leuconostoc mesenteroides* apresentam maior efeito contra *Aspergillus niger* (MANINI et al., 2016).

Vários mecanismos também foram propostos para explicar a atividade antagônica das leveduras em relação a outros fungos, e incluem a produção de toxinas letais e outros compostos inibitórios, competição por nutrientes e espaço, produção de metabólitos, como etanol, acetaldeído, acetato de etila e ácidos graxos que são tóxicos para outros fungos (PUNJA e UTKHEDE, 2003). Em relação ao *sourdough*, a atividade antifúngica é a mais estudada e parece estar baseada na produção de acetato de etila (CODA et al., 2011; CODA et

*al.*, 2014). A *W. anomalus*, uma das espécies de leveduras isoladas no *sourdough* (RIPARI, CECCHI, *et al.*, 2016; VAN KERREBROECK *et al.*, 2016), é capaz de inibir o crescimento de fungos em grãos de cereais (PETERSSON e SCHNURER, 1995). A atividade antifúngica é encontrada em *sourdough* com cepa *W. anomalus* LCF 1695, mas o efeito pode ser aumentado por uma co-cultivação com uma estirpe *L. plantarum* 1A7 que produz peptídeos antifúngicos (CODA *et al.*, 2011). Outro exemplo de estirpe antifúngica é *Meyerozyma guilliermondii* LCF 1353 (CODA *et al.*, 2014).

Portanto, as leveduras são capazes de inibir as micotoxinas degradando-as ou ligando-as por um mecanismo de adesão aos componentes da parede celular (MOSLEHI-JENABIAN *et al.*, 2010). No caso das BALs, dois processos parecem estar envolvidos na interação entre elas e algumas micotoxinas, a ligação e a inibição de sua biossíntese (DALIÉ *et al.*, 2010). Fazeli *et al.* (2009) descobriram que *L. casei* tem uma habilidade mais forte para se ligar à aflatoxina em comparação a outras cepas de *L. fermentum* e *L. plantarum* testadas. Em particular, Niderkorn *et al.* (2009) descobriram que a interação entre as micotoxinas e as BALs parece ser influenciada pela composição de aminoácidos do peptidoglicano.

Além de sua capacidade antifúngica, as BALs produzem ácidos orgânicos e compostos antibacterianos efetivos. Katina *et al.* (2002) verificaram que *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* são inibidos por *L. plantarum* VTT E-78076 e *P. pentosaceus*, estes resultados foram confirmados em um estudo de Valerio *et al.* (2008), em que a contaminação induzida por *Bacillus spp* foi inibida por *L. plantarum*.

Também é conhecida uma ação antifúngica combinada, quando um composto antifúngico é produzido somente quando duas cepas interagem. Isto é mostrado, por exemplo, em uma co-fermentação entre *L. bucheri* que produz 1,2-propandiol e *L. diolivorans* que transformam 1,2-propandiol em ácido propiônico, um ácido orgânico com a ação antifúngica (ZHANG *et al.*, 2010).

#### 1.3.4 Aumento do valor nutricional e digestibilidade

A biodisponibilidade de cátions, como cálcio, potássio, magnésio, ferro, zinco e fósforo, pode ser limitada devido à presença de ácido fítico. O ácido

fítico é um composto antinutricional devido à sua estrutura molecular, sendo capaz de quelar cátions e formar fitato, um complexo insolúvel, deixando os minerais não biodisponíveis. As fitases são as principais enzimas capazes de desfosforilar o fitato. Entre as enzimas endógenas presentes na farinha é possível encontrar as fitases, mas a ação desta é favorecida em ambiente ácido (4,5 é o pH ótimo) (FRETZDORFF e BRÜMMER, 1992). Desta forma, metabolismo das BALs e a consequente produção de ácidos orgânicos e redução do pH, conduz a maior atividade das fitases e o aumento da biodisponibilidade dos minerais. Além disso, algumas BALs e leveduras são capazes de produzir fitases. Chaoui et al. (2003) demonstraram que, usando uma combinação de leveduras e BALs (*S. cerevisiae*, *L. plantarum* e *Lc. Mesenteroides*), é possível aumentar a biodisponibilidade dos cátions.

A quantidade total de ácido fólico aumenta consideravelmente durante a fermentação por *sourdough* devido ao crescimento das leveduras (OSSEYI et al., 2001). Durante o processo de assamento, cerca de 25% do conteúdo de folato é perdido (KARILUOTO et al., 2004), mas a quantidade final de folato depende também da microbiota e da atividade amilolítica da farinha, não apenas das condições de assamento (JÄGERSTAD et al., 2005). Kariluoto et al. (2004) investigaram a capacidade das leveduras do *sourdough* (*S. cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* e *Candida milleri*) e BALs para produzir ou consumir folatos durante a fermentação do *sourdough*. Em particular, o mesmo estudo mostrou como as leveduras aumentaram o conteúdo de folato de uma massa de farinha de centeio, enquanto os BALs a consumiram. Em co-cultivos com leveduras, o efeito BALs sobre a quantidade de folato foi diminuído.

A digestibilidade do pão fermentado com *sourdough* é maior do que do pão convencional. Isso pode acontecer devido ao longo tempo de fermentação do *sourdough* e à microbiota utilizada. Durante a fermentação do *sourdough*, os carboidratos complexos são hidrolisados em açúcares simples e digeríveis, já a proteína é dividida em aminoácidos ou peptídeos. A maior parte do amido é metabolizada em ácido láctico, etanol, CO<sub>2</sub> e ácidos orgânicos. Portanto, a disponibilidade do amido restante é reduzida, afetando o índice glicêmico (GI) do produto final. A formação de ácido orgânico, principalmente ácido láctico, reduz a digestibilidade do amido (LILJEBERG et al., 1995). Portanto, o ácido

acético e propiônico estendem a taxa de esvaziamento gástrico (LILJEBERG e BJORCK, 1998). A fermentação do *sourdough* diminui a gelatinização de amido e promove a formação de amido resistente (ÖSTMAN, 2003). Além disso, a densidade do pão é incrementada pela acidificação (BURTON e LIGHTOWLER, 2007).

#### 1.4 ENRIQUECIMENTO DO *SOURDOUGH* COM DIFERENTES VARIEDADES DE FARINHA

O *sourdough* foi desenvolvido originalmente para ser utilizado como agente natural de fermentação na produção de pão de trigo ou de centeio. Ao longo do tempo, começou a ser aplicado a outros produtos de panificação feitos de farinha de trigo integral. Mais recentemente, visando a melhoria da qualidade nutricional dos produtos obtidos com *sourdough*, vários estudos foram conduzidos, avaliando a possibilidade de enriquecer ou substituir a farinha de trigo e centeio por outros grãos e farinhas. Alguns exemplos de grãos adicionados na produção de *sourdough* são: quinoa (*Chenopodium quinoa*) (SWIECA *et al.*, 2014; IGLESIAS-PUIG *et al.*, 2015; RIZZELLO *et al.*, 2016); semolinas (*Triticum durum*) (ALFONZO *et al.*, 2017); amaranto (*Amaranthus*) (STERR *et al.*, 2009; MACHADO ALENCAR *et al.*, 2015); trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*) (COSTANTINI *et al.*, 2014; STOKIĆ *et al.*, 2015; AGUILAR *et al.*, 2016); sementes de chia (*Salvia hispanica* L.) (COSTANTINI *et al.*, 2014); sementes germinadas (DIOWKSZ *et al.*, 2014). Outros tipos de farinha utilizadas na produção de *sourdough* são: farinha de cevada (MARKLINDER *et al.*, 1996; ZANNINI *et al.*, 2009; RIEDER *et al.*, 2012; SULLIVAN *et al.*, 2013; MARIOTTI *et al.*, 2014; Ktenioudaki *et al.*, 2015); centeio com farinha de cevada (PEJCZ *et al.*, 2015); farinha de sorgo (GALLE *et al.*, 2012); Teff (CAMPO *et al.*, 2016); soro de leite misturado com farinha de cevada (SLUKOVÁ *et al.*, 2016) e farinha vegetal (RIZZELLO *et al.*, 2014; CURIEL *et al.*, 2015).

Tanto no pão fermentado com *sourdough* quanto no pão feito apenas com levedura, a composição da farinha influencia diretamente as características sensoriais e nutricionais dos produtos finais (ARENDT *et al.*, 2007). Com a adição de grãos de trigo integral e farinha vegetal, observa-se

um aumento na concentração de minerais, proteínas e especialmente fibras. A fibra possui a capacidade de se unir fortemente a água, permanecendo assim menos água livre para a formação da rede de glúten, além de diminuir a capacidade de retenção de gás, resultando em produtos com menor volume. Outra característica observada é a menor umidade no miolo e um aumento na firmeza no produto fresco (IZYDORCZYK e DEXTER, 2008). Conforme descrito no item 4.3, durante a vida útil do pão, ocorre naturalmente a perda de umidade do miolo para a crosta e a retrogradação da amilopectina, resultando em aumento da firmeza do miolo e redução da vida útil do produto (MARIOTTI *et al.*, 2014; KTENIOUDAKI *et al.*, 2015). Tanto no *sourdough* como no pão fermentado apenas com levedura, a umidade inicial dos produtos sem glúten é menor que dos produtos que com glúten, o que resulta na redução da vida útil. Todos esses fatores contribuem para a redução da aceitabilidade de produtos ricos em fibras e produtos sem glúten.

Estudos visando a redução da firmeza em produtos sem glúten, avaliaram a possibilidade de adicionar xilanases em pães com e sem adição de *sourdough* (KTENIOUDAKI *et al.*, 2015) e hidrocolóides, como: goma xantana, carrageninas e exopolissacarídeos na massa (DAVIDOU *et al.*, 1996; KORAKLI *et al.*, 2001; BRANDT, 2007; LAZARIDOU *et al.*, 2007; KETABI *et al.*, 2008; SHITTU *et al.*, 2009; GALLE *et al.*, 2012; HAGER e ARENDT, 2013; MOHAMMADI *et al.*, 2014; WOLTER *et al.*, 2014; BUREŠOVÁ *et al.*, 2016). Os hidrocolóides atuam como um substituto do glúten, ligando-se a água da massa e retardando a retrogradação do amido, que é outra causa da firmeza no produto (BELITZ *et al.*, 2008). Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de alta massa molar que são compostos de resíduos de açúcar, que também atuam como hidrocolóides. Algumas espécies de BAL têm a capacidade de produzir EPS, entre elas: *Ln. mesenteroides*, *W. confusa*, *W. cibaria*, *L. plantarum* (LACAZE *et al.*, 2007; KATINA *et al.*, 2009) no entanto, *L. sanfranciscensis*, uma BAL encontrada em uma grande maioria de variedades de *sourdough*, é EPS negativo (KADITZKY *et al.*, 2007). A capacidade de produção de EPS, por BALs positivas durante a fermentação do *sourdough*, depende da atividade metabólica da fermentação (GÄNZLE, M. G. *et al.*, 2007); sendo que o EPS produzido diferi em composição e estrutura química



dependendo do micro-organismo e do substrato utilizado (DE VUYST e DEGEEST, 1999; SCHWAB *et al.*, 2008; WOLTER *et al.*, 2014).

Wolter *et al.* (2014) identificaram a produção do EPS dextrano por *W. cibaria* em *sourdough* sem glúten, contendo trigo sarraceno, quinoa e teff, o que resultou em características sensoriais melhoradas, como textura e sabor, quando comparadas ao pão fermentado usando apenas leveduras.

### 1.5 COMERCIALIZAÇÃO DO SOURDOUGH

Na década de 1920, a primeira massa ácida chegou ao mercado, uma mistura não fermentada de farinha pré-gelatinada adicionada com ácido láctico conhecido como '*Ireks Fertig Sauer*' (BENEDICKT e MEYER, 2003). Uma vez que este *sour dough* não foi bem recebido pelo público, em 1970 começou o desenvolvimento de um *sourdough* desidratado, o qual poderia ser usado por padarias e grandes centros de produção (BRANDT, 2007). Atualmente, o *sourdough* do tipo III também está sendo comercializado em mercados locais para uso doméstico.

A massa desidratada tem uma vida útil mais longa em comparação com as massas frescas devido à sua menor susceptibilidade à contaminação por micro-organismos e à sua maior estabilidade físico-química. Essas características facilitaram a comercialização do fermento e levaram ao desenvolvimento de diferentes variedades de *sourdough* tipo III aplicadas como inóculos em esponjas-massa. Alguns exemplos são os inóculos de *sourdoughs* desenvolvidos para o uso em produtos à base de farinha de centeio e farinha de trigo integral. Inóculo de *sourdough* de centeio e de trigo integral, *sourdough* sem glúten, para fabricação de panquecas, *waffles* e até mesmo *sourdoughs* tradicionais do pão *San Francisco*. Na Tabela 3 é apresentada a variedade de *sourdough* de tipo III comercializados em vários países, assim como a farinha utilizada na produção do *sourdough*.

TABELA 3 - SOURDOUGHS TIPO III COMERCIALIZADOS EM DIFERENTES PAÍSES

continua

Tipo de Farinha - Sourdough	Aplicação do Sourdough	Países de comercialização	Indústria
<b>Trigo</b>	Pão <sup>g, h, k, n, t, u</sup>	Itália <sup>g, h</sup> Alemanha <sup>k, l, n</sup> Argentina <sup>t</sup> Espanha <sup>u</sup> França e Brasil (No Brasil comercializado por Vallens) <sup>v</sup> França, Bélgica, México, Espanha, Marrocos e Brasil <sup>z</sup>	S. Martino <sup>g</sup> Molino Rossetto <sup>h</sup> Alnatura <sup>k</sup> BioVita <sup>l</sup> Kron Jäst <sup>n</sup> Lesaffre <sup>t</sup> Indespan <sup>u</sup> Philibert Savours <sup>v</sup> Eurogerm <sup>z</sup>
	Pão e pizza <sup>d</sup>	França <sup>d</sup> França e Brasil (No Brasil comercializado por Vallens) <sup>v</sup>	Nat-ali <sup>d</sup> Philibert Savours <sup>v</sup>
	Produtos de panificação em geral <sup>b, e, f, h, o, q</sup>	Estados Unidos da América <sup>b</sup> França <sup>e, f</sup> Itália <sup>h</sup> Alemanha <sup>o</sup> Bélgica <sup>q</sup> França e Brasil (No Brasil comercializado por Vallens) <sup>v</sup> França, Bélgica, México, Espanha, Marrocos e Brasil <sup>z</sup>	Real Sourdough Bread <sup>b</sup> Priméal <sup>e</sup> Markal- Bio <sup>f</sup> Molino Rossetto <sup>h</sup> Seitenbacher <sup>o</sup> Ireks <sup>q</sup> Philibert Savours <sup>v</sup> Eurogerm <sup>z</sup>
	Pão francês or <i>Pain au levain</i> ; pão <i>San Francisco</i> ; panquecas e waffle <sup>a</sup>	Estados Unidos da América <sup>a</sup> França e Brasil (No Brasil comercializado pela Vallens) <sup>v</sup>	Goldrush <sup>a</sup> Philibert Savours <sup>v</sup>
	Pão <i>San Francisco</i> e Produtos de panificação em geral (cultura da Nova Zelândia, França e Itália) <sup>c</sup>	Nova Zelândia <sup>c</sup>	Breadnz <sup>c</sup>
	bolos <sup>s</sup>	Brasil e Espanha <sup>s</sup>	Puratos <sup>s</sup>
	<b>Kamut® trigo</b> Pão, pizza, bolos (culture from France) <sup>i</sup> Pão <sup>u</sup>	Itália <sup>i</sup> França e Brasil (No Brasil comercializado por Vallens) <sup>v</sup>	Antico Molino Rosso <sup>i</sup> Philibert Savours <sup>u</sup>
<b>Trigo Integral</b>	Produtos de panificação em geral <sup>b, f</sup>	Estados Unidos da América <sup>b</sup> França <sup>f</sup> França, Bélgica, México, Espanha, Marrocos e Brasil <sup>z</sup>	Real Sourdough Bread <sup>b</sup> Markal- Bio <sup>f</sup> Eurogerm <sup>z</sup>
	Pão <sup>u</sup>	França e Brasil (No Brasil comercializado por Vallens) <sup>v</sup>	Philibert Savours <sup>u</sup>
<b>Centeio</b>	Pão <sup>k, l, u</sup>	Alemanha <sup>k, l</sup> França e Brasil (No Brasil comercializado por Vallens) <sup>v</sup>	Alnatura <sup>k</sup> BioVita <sup>l</sup> Philibert Savours <sup>u</sup>
	Produtos de panificação em geral <sup>b, m, n, q</sup>	Estados Unidos da América <sup>b</sup> Nova Zelândia	Real Sourdough Bread <sup>b</sup> Breadnz, <sup>c</sup> Biovegan <sup>m</sup>



(conclusão)			
Tipo de Farinha - <i>Sourdough</i>	Aplicação do <i>Sourdough</i>	Países de comercialização	Indústria
<b>Centeio</b>	Produtos de panificação em geral (culturas da Nova Zelândia e França) <sup>c</sup>	Alemanha <sup>m, n</sup> Bélgica <sup>q</sup> França, Bélgica, México, Espanha, Marrocos e Brasil <sup>z</sup>	Kron Jäst <sup>n</sup> Ireks <sup>q</sup> Eurogerm <sup>z</sup>
<b>Trigo Espelta</b> ( <i>Triticum spelta</i> )	Pão <sup>l</sup>	Alemanha <sup>l</sup>	BioVita <sup>l</sup>
	Produtos de panificação em geral <sup>m</sup>	Alemanha <sup>m</sup>	Biovegan <sup>m</sup>
	bolos, pão e pizza (culture from France) <sup>i</sup>	Itália <sup>i</sup>	Antico Molino Rosso <sup>i</sup>
<b>Trigo Espelta e Centeio</b>	Pão <sup>o</sup>	Alemanha <sup>o</sup>	Seitenbacher <sup>o</sup>
<b>Quinoa</b>	Produtos de panificação em geral <sup>m</sup>	Alemanha <sup>m</sup>	Biovegan <sup>m</sup>
<b>Malte</b>	Produtos de panificação em geral <sup>q</sup>	Bélgica <sup>q</sup>	Ireks <sup>q</sup>
<b>Malte e Trigo</b>	Produtos de panificação em geral <sup>j</sup>	Itália <sup>j</sup>	Paneangeli <sup>j</sup>
<b>Arroz</b>	Produtos de panificação sem glúten <sup>b</sup>	Estados Unidos da América <sup>b</sup>	Real Sourdough Bread <sup>b</sup>
<b>Arroz marrom</b>	Produtos de panificação sem glúten <sup>c</sup>	Nova Zelândia <sup>c</sup>	Breadnz <sup>c</sup>
<b>Amido de Tapioca</b>	Produtos de panificação sem glúten <sup>h</sup>	Itália <sup>h</sup>	Molino Rossetto <sup>h</sup>
<b>Farro</b> ( <i>Triticum turgidum</i> ssp)	Produtos de panificação em geral <sup>e</sup>	França <sup>e</sup>	Priméal <sup>e</sup>
	Bolos, pão e pizza (cultura da UE) e produtos de panificação <sup>i</sup>	Itália <sup>i</sup>	Antico Molino Rosso <sup>i</sup>
<b>Trigo Sarraceno</b>	Pão <sup>v</sup>	França e Brasil (No Brasil comercializado por Vallens) <sup>v</sup>	Philibert Savours <sup>v</sup>

<sup>a</sup> Goldrush, 2016; <sup>b</sup> Real Sourdough, 2016; <sup>c</sup> Breadnz, 2016; <sup>d</sup> Nat-ali, 2016; <sup>e</sup> Priméal, 2016; <sup>f</sup> Markal-Bio, 2016; <sup>g</sup> S. Martino, 2016; <sup>h</sup> Molino Rossetto, 2016; <sup>i</sup> Antico Molino Rosso, 2016; <sup>j</sup> Paneangeli, 2016; <sup>k</sup> Alnatura, 2016; <sup>l</sup> Biovita, 2016; <sup>m</sup> Biovegan, 2016; <sup>n</sup> Seitenbacher, 2016; <sup>o</sup> Kronjast, 2016; <sup>p</sup> Torsleffs, 2016; <sup>q</sup> Ireks Iberica, 2016; <sup>r</sup> Dayelet, 2016; <sup>s</sup> Puratos, 2016; <sup>t</sup> Lesaffre, 2016; <sup>u</sup> Indespan, 2016; <sup>v</sup> Philibert Savours, 2016; <sup>z</sup> Eurogem, 2017

Na Tabela 3, é possível visualizar que o *sourdough* tipo III é mais comercializado no hemisfério norte. A Itália, a França e a Alemanha são os países que mostram a maior variedade de *sourdough* com diferentes farinhas: Farro - *Triticum turgidum* sp., amido de tapioca, trigo mourisco, malte, quinoa e espelta; para aplicações em pizza, bolos e produtos de padaria em geral.

Para seguir a tendência nutricional de produtos sem glúten, pode-se ver na Tabela 3 que algumas empresas do hemisfério norte, comercializam *sourdough* fermentado com farinhas de arroz branco, arroz integral, centeio e

quinoa. Além disso, vários *sourdoughs* são fermentados em farinhas integrais para adicionar mais qualidade nutricional aos produtos finais. Já no hemisfério sul, o consumo do *sourdough* ainda é pequeno e, portanto, tem uma variedade menor de *sourdough* tipo III sendo comercializado, tendo o trigo e o trigo sarraceno como os únicos substratos utilizados. Em muitos desses países, como no Brasil, a comercialização do *sourdough* tipo III destina-se a empresas, em embalagens de 25 kg e com alto custo (US\$ 10.00-20.00 Kg<sup>-1</sup>), devido às taxas de importação da Bélgica (Puratos) e da França (Vallens e Eurogerm). Portanto, os produtos fabricados com *sourdough*, nestes países, são conhecidos como produtos de fermentação lenta e são produzidos principalmente com farinha de trigo, farinha de trigo integral e misturas de farinha, por padarias tradicionais que utilizam o processo tradicional (Tipo I). A produção do *sourdough* tipo III ainda pode ser explorada através da aplicação de novas tecnologias de produção e do uso de diferentes farinhas e micro-organismos.

## 1.6 SÍNTESE

Atualmente, os produtos de panificação com farinhas integrais são os mais procurados pelos consumidores, devido as melhores qualidades nutricionais no produto final. No entanto, o uso de farinhas integrais reduz o volume do produto, interferindo diretamente na textura do produto. O uso do *sourdough* é uma forma de melhorar o valor nutricional e as características sensoriais (aroma, sabor, textura) dos produtos de panificação. Apesar das vantagens significativas do uso do *sourdough*, esse produto é disseminado e amplamente comercializado em apenas alguns países, enquanto que na maior parte do mundo é restrito na produção de pão artesanal. Isso mostra a necessidade de propagar e diversificar as indústrias de fabricação do *sourdough* em todo o mundo.

**ARTIGO II*****SOURDOUGH* BRASILEIRO: EVOLUÇÃO MICROBIOLÓGICA,  
ESTRUTURAL E TECNOLÓGICA**

Este artigo foi publicado na revista European Food Research and Technology –  
Anexo B

## Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento de bactérias do ácido láctico (BAL) e de leveduras, o consumo de carboidratos e a produção de ácidos orgânicos e compostos voláteis no *sourdough* brasileiro. Além disso, o impacto da fermentação nas modificações estruturais da massa também foi analisado por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier e por microscopia eletrônica de varredura. As avaliações do *sourdough* revelaram que as principais alterações bioquímicas ocorreram até o 3º dia: maior crescimento das BALs, aumento da acidez, produção de álcool e ácidos carboxílicos, modificações na amida I e II do glúten e a hidrólise do amido. Entre o 3º e 5º dia ocorreu o desaparecimento do ácido butanóico e a formação de diferentes ésteres. Conforme demonstrado pela análise de componentes principais, o *sourdough* tornou-se maduro após o 5º dia, revelando a estabilização dos parâmetros bioquímicos e tecnológicos, além da presença significativa de ésteres e ácidos carboxílicos. Portanto, este trabalho reconhece que o *sourdough* tradicional brasileiro requer pelo menos 5 dias de fermentação para obter as qualidades tecnológicas e compostos voláteis ideais para aplicações de panificação.

Palavras-chave: Compostos voláteis; *Sourdough*; Aplicações de padaria; Farinha de trigo

## 2 SOURDOUGH BRASILEIRO: EVOLUÇÃO MICROBIOLÓGICA, ESTRUTURAL E TECNOLÓGICA

### 2.1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui cerca de 278.000 hectares de áreas destinadas à produção agrícola. Em 2016, foi responsável pela produção de aproximadamente 6,8 milhões de toneladas de trigo (FAOSTAT, 2016). De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias do Trigo (ABI, 2017), o Brasil não é auto-suficiente e, portanto, importa trigo e farinha de trigo da Argentina, Estados Unidos, Paraguai, Uruguai e outros países, resultando na presença de farinhas distintas no mercado nacional. A farinha de trigo é a principal matéria-prima de uma grande variedade de alimentos à base de cereais (por exemplo, pão, macarrão e biscoitos, etc.) (SINGH *et al.*, 2017).

Antes da produção comercial do fermento no século XIX, uma massa fermentada espontaneamente pelas leveduras e bactérias presentes na farinha, produzindo uma massa conhecida como *sourdough* tradicional, era utilizada como fermento na produção de pão de centeio (LÖNNER *et al.*, 1986). A fermentação da massa é iniciada pela microbiota do substrato utilizado. Durante a propagação ou alimentação diária, ocorre a estabilidade do ecossistema de massa-mãe e a seleção das BALs que é caracterizada por uma evolução trifásica microbiana (ERCOLINI *et al.*, 2013). A farinha abriga vários micro-organismos, tais como bactérias entéricas, formadoras de esporos e fungos, mas também várias leveduras e espécies de BAL. Durante a propagação, ocorre a redução do potencial redox e do pH da massa, devido à fermentação das BALs, inibindo todos os micro-organismos sensíveis à acidez e aos ácidos orgânicos, levando a uma seleção espontânea dos micro-organismos (SIEPMANN *et al.*, 2018).

Devido à predominância das BALs e leveduras na massa, são formados os compostos voláteis característicos do *sourdough*, como ácidos carboxílicos, álcoois, alcanos, aldeídos e ésteres, produzindo um aroma complexo e único. Além disso, devido ao aumento da acidez, ocorrem modificações na estrutura do glúten e do amido, gerando uma massa mais elástica.

O final da fermentação é definido quando os micro-organismos presentes são adequados e os parâmetros tecnológicos (isto é, acidez e contagens microbianas) são estáveis, neste momento a massa fermentada torna-se "madura".

A fermentação do *sourdough* é um processo complexo, que não é totalmente elucidado, principalmente pelas alterações sofridas pelo uso de um substrato diferente, temperatura e processo de propagação. No Brasil, a tecnologia do *sourdough* é pouco explorada, desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a evolução das características bioquímicas, produção de aromas e alterações na microestrutura do glúten e do amido durante o processo de fermentação do *sourdough* brasileiro.

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 Preparação e propagação de *sourdough*

O *sourdough* foi preparado e propagado em triplicata usando o protocolo de Pontonio *et al.* (2015) com modificação. A farinha de trigo integral (adquirida em mercado local) foi misturada com água estéril e incubada a 28 ° C durante 24 h. O rendimento da massa ( $RM = \text{peso da massa} \times 100 / \text{peso da farinha}$ ) foi de 160. Após a primeira fermentação, oito etapas de propagações foram realizadas, misturando 25% da massa previamente fermentada com a mesma farinha e água (RM de 160) e incubadas durante 24 h a 28° C.

### 2.2.2 Parâmetros tecnológicos do *sourdough*

As amostras de *sourdough* foram coletadas a 0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias de fermentação (antes de cada propagação) para análises em triplicatas de pH, acidez titulável, contagem em placa de BALs e leveduras, quantificação dos ácidos orgânicos (acético e láctico) e dos carboidratos (frutose, glicose, maltose e amido) e identificação de compostos voláteis. As espectroscopias de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas para identificar diferenças na estrutura da massa.

### 2.2.3 pH e acidez titulável (ATT)

O pH da massa foi determinado por meio de um pHmetro (MS Tecnopon, Modelo Luca-210, Brasil), diluindo 10 gramas da amostra em 90 mL de água destilada. Esta mesma amostra também foi usada para determinação ATT total e expressa como a quantidade (mL) de 0,1N NaOH necessária para solução atingir o pH de 8,5 (NIONELLI *et al.*, 2014).

### 2.2.4 Análises microbiológicas

A determinação microbiológica foi realizada através da diluição de 10g de cada amostra de *sourdough* em 90 mL de solução de água peptonada estéril (1% [p vol<sup>-1</sup>] de peptona e 0,9% [p vol<sup>-1</sup>] NaCl) e homogeneizada em um *stomacher* (BagMixer® 400; Interscience, França ) durante 2 min à velocidade máxima, e depois submetido a diluições decimais apropriadas. A contagem de BAL foi realizada em meio MRS adicionado de antifúngico (ciclopirox olamine 10 mg mL<sup>-1</sup>), com uma sobrecamada de ágar-ágar e incubada a 37 ° C por 48h. Dicloran Rosa Bengala (DRBC) agar com 1mg L<sup>-1</sup> de cloranfenicol (Himedia, Índia) incubado aerobicamente a 28 °C durante 48-72 h foi usado para contagem total de levedura.

### 2.2.5 Quantificação dos carboidratos (maltose, glicose, frutose e amido) e dos ácidos orgânicos (ácido láctico e acético)

A cromatografia Líquida de Ultra-Performance (UPLC; Waters, modelo Acquity, Brasil) com detecção do índice de refração (IR) foi utilizada para quantificação dos açúcares solúveis (maltose, glicose e frutose) e ácidos orgânicos. A etapa de extração foi realizada adicionando 1g de amostra em 1,0mL de água ultrapura e mantida em repouso por 30 min. A solução foi centrifugada por 20 min (3.493 x g) e filtrada através de filtros de nylon de 0,22 µm (Millipore). As condições para quantificação foram: coluna HPX-87H (300x7.8mm) com temperatura de 50 °C, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM com vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup> como fase móvel e volume de injeção de 10 µL. A quantificação do amido foi realizada de acordo com Fuwa (1954)



### 2.2.6 Compostos voláteis

Os compostos voláteis foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa HS-SPME (Micro-Extração em Fase Sólida Head-Space; Shimadzu, modelo TQ8040, Japão) em técnica de isolamento utilizando 5 g de massa. Os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 1. Os espectros de massa foram adquiridos em modo de impacto de elétrons (70 eV), utilizando varredura completa com análise de massa na faixa  $m/z$  30–400. A temperatura da linha de transferência foi estabelecida a 270 °C.

TABELA 1 - CONDIÇÃO UTILIZADA NA IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NO *HEAD-SPACE*) CG-HS-SPME

<b>Etapa</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Temperatura °C</b>
Aquecimento da amostra	30	60
Extração dos compostos na amostra – Exposição da fibra Carboxen/Polydimethylsiloxane – (CAR/PDMS) nas amostras	30	60
Dessorção	5	260
	0	60
	5	85
	10	110
	15	135
	20	160
Rampa de aquecimento para identificação dos compostos voláteis	25	185
	30	210
	35	235
	40	260
	45	260
	50	285
	52,5	300

### 2.2.7 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos usando o espectrômetro FT-IR (MIDAC, Fox 8100, EUA) equipado com espectroscopia por transformada de Fourier de infravermelho por refletância difusa (DRIFTS). O software PETRO-QUANT foi utilizado para aquisição espectral e controle instrumental. Os espectros foram coletados na faixa de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  a uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , e 32 varreduras acumuladas foram co-adicionadas para produzir um espectro.

### 2.2.8 Preparação de amostras de massa para microscopia eletrônica de varredura - MEV

As amostras de *sourdough* foram congeladas e liofilizadas (-50 ° C) (Liotop, modelo L101, Brasil) para análise no MEV. Os pedaços liofilizados de amostras de massa foram cobertos com ouro para exposição interior. As amostras foram analisadas com uma visão superior e transversal e fotografadas com um microscópio eletrônico de varredura de alta performance (Jeol, JSM 6360, EUA) a uma voltagem de aceleração de 15 kV. As ampliações foram 500, 1500 e 6000x.

### 2.2.9 Análise estatística

Análises gráficas e análises estatísticas (ANOVA e teste de Tukey) foram realizadas utilizando o *Statistic 7.0* (Statsoft, OK, USA). Para a Análise de Componentes Principais (PCA) foi utilizada a Caixa de Ferramentas PLS (ver. 6.2, Eigenvector, Natwick USA) no software MATLAB (7.0). Os dados espectrais foram centrados na média usando MSC (correção de dispersão multiplicativa) e após derivada.

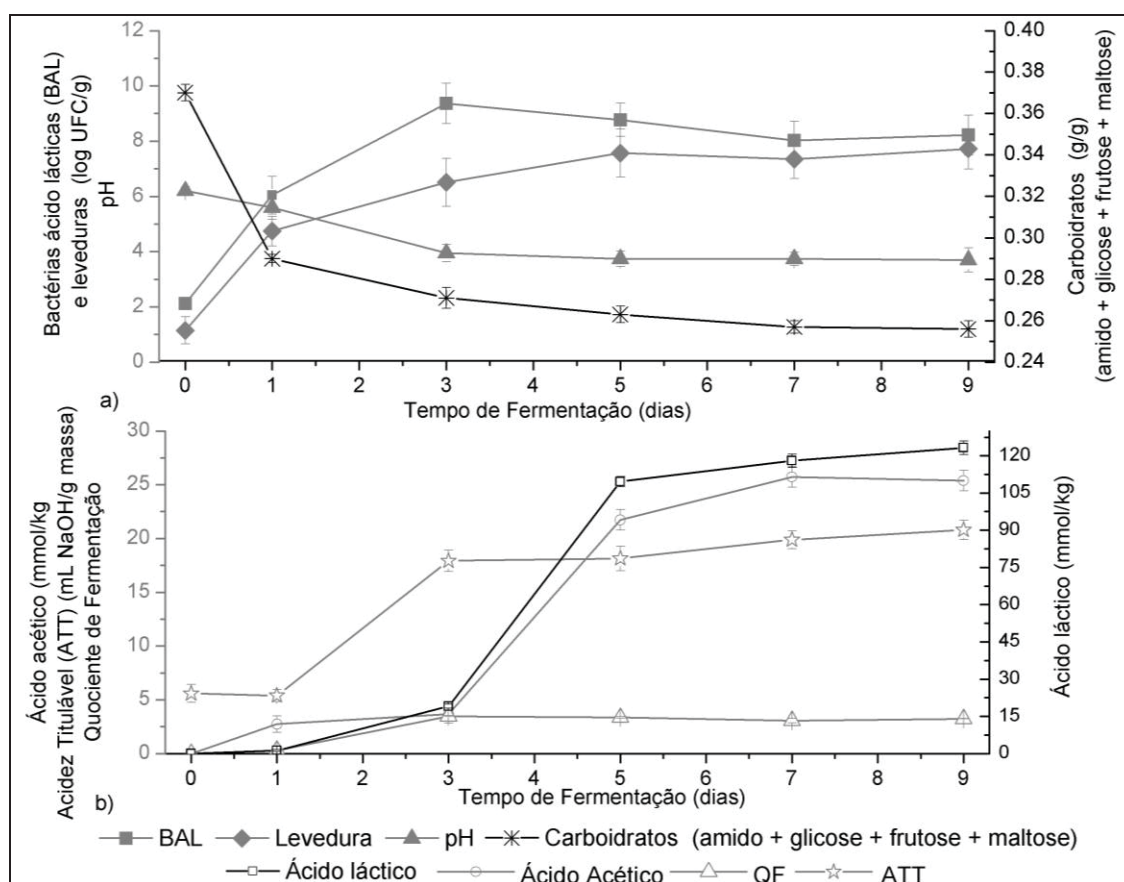
## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.3.1 Cinética de crescimento das BALs e das leveduras

Na Figura 1 é possível avaliar a cinética de crescimento das BALs e das leveduras durante a fermentação do *sourdough*. Com apenas 24h de fermentação, a densidade celular das BALs e das leveduras atingiu valores 3x superiores aos encontrados no início da fermentação. As BALs mantiveram o crescimento rápido (com diferença estatística  $p < 0,05$ ) até o 3º dia. Nos dias seguintes, houve redução estatisticamente significativa ( $p < 0,5$ ) na densidade celular. Já as leveduras mostraram o crescimento até o 7º dia de fermentação, atingindo 7,80 logs UFC g<sup>-1</sup>. Até o momento, nenhum estudo avaliou a cinética de crescimento de BALs e leveduras durante a fermentação do *sourdough* tradicional sem a adição de inóculo. No entanto, a concentração final de BAL e de levedura (8,3 logs UFC g<sup>-1</sup> e 7,80 logs UFC g<sup>-1</sup>) deste trabalho são

semelhantes aos encontrados por Yan *et al.* (2019); Liu *et al.* (2016) em *sourdough* tradicional. Assim, embora a microbiota da farinha tenha apresentado rápida adaptação ao meio, atingindo a fase log no primeiro dia de fermentação, a estabilização das contagens de células foi alcançada somente após cinco dias de fermentação.

FIGURA 1 - AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E TECNOLÓGICA DO *SOURDOUGH* BRASILEIRO DURANTE 9 DIAS DE FERMENTAÇÃO



(a) crescimento cinético de bactérias do ácido láctico e levedura, (b) produção de ácidos orgânicos

Durante a fermentação, as hexoses são consumidas pelas BALs homofermentativas para a produção do ácido láctico. As BALs heterofermentativas produzem ácido láctico, CO<sub>2</sub>, ácido acético e / ou etanol a partir de hexoses / pentoses. As BALs homofermentativas facultativas podem agir como homo ou heterofermentativa dependendo do substrato usado (AXELSSON, 1999)

Na farinha utilizada neste trabalho foram identificadas a *L. plantarum* (homofermentativa facultativa) e *P. pentosaceus* (homofermentativa) (apêndice A). No início da fermentação, a massa apresentava 0,371 g g<sup>-1</sup> dos carboidratos quantificados (0,355 g g<sup>-1</sup> de amido, 0,008 g g<sup>-1</sup> de maltose, 0,004 g g<sup>-1</sup> de glucose e 0,003 g g<sup>-1</sup> de frutose). O amido é hidrolisado em maltodextrinas, maltose e glucose pela ação de enzimas amilase ( $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e glucoamilases) presentes na farinha de trigo e centeio, e em sacarose durante a fermentação (AXELSSON, 1999; BRANDT, 2007). No 1º dia de fermentação, mais de 25% do amido foi hidrolisado, liberando glucose e maltose em concentrações maiores que o consumido, gerando um acúmulo desses açúcares solúveis (0,012 g g<sup>-1</sup> maltose; 0,008 g g<sup>-1</sup> glucose e 0,006 g g<sup>-1</sup> frutose). No entanto, a partir do 3º dia com o rápido crescimento das BALs e das leveduras, os açúcares metabolizáveis foram consumidos quase na totalidade, atingindo valores médios de 0,002 g g<sup>-1</sup> de maltose, glucose e frutose. O alto consumo de açúcar foi identificado até o final da fermentação, encontrando-se concentração próxima a 0,001 g g<sup>-1</sup>. Devido ao metabolismo do açúcar ocorre a produção de ácido láctico e ácido acético, e mudanças físico-químicas no interior da massa.

Durante a fermentação e propagações da massa, o potencial redox da massa diminui, favorecendo as BALs e as leveduras (ERCOLINI *et al.*, 2013) ao invés da população microbiana inicial. A Figura 1 (b) mostra um aumento gradual e significativo ( $p < 0,5$ ) do ácido láctico do 3º (19,03 mmol kg<sup>-1</sup>) para o 9º dia de fermentação (123,25 mmol kg<sup>-1</sup>), sendo a maior produção identificada entre o 3º e o 5º dia. Entretanto, o ácido acético passou a ser produzido em concentrações significativas ( $p < 0,5$ ) já no 1º dia, com 2,73 mmol kg<sup>-1</sup>, e após o sétimo dia a concentração se estabilizou ( $p > 0,5$ ), chegando a 25,32 mmol kg<sup>-1</sup> no fim da fermentação.

A razão molar entre o ácido láctico e o ácido acético na massa é utilizada para determinar o Quociente de Fermentação (QF), um parâmetro com um efeito positivo no perfil do aroma e na estrutura dos produtos finais (SPICHER, 1983). No 1º dia, devido à baixa concentração de ácido láctico, o QF também foi menor (0,30). No 3º dia, com o incremento na densidade celular das BALs e na concentração de ácidos orgânicos, respectivamente, o QF

aumentou significativamente ( $p < 0,5$ ), atingindo 3,48. Após o 3º dia, o QF permaneceu estatisticamente estável ( $p > 0,5$ ) até o final da fermentação (3,24). Na literatura, o *sourdough* mostra uma ampla gama nos valores de QF, por exemplo, 2,03-6,49 (CORONA *et al.*, 2016). A variação nos resultados do QF é explicada devido à correlação direta entre a concentração de ácidos orgânicos, a temperatura de fermentação e o metabolismo dos micro-organismos. A temperatura entre 25-30 ° C favorece a produção de ácido acético, enquanto a temperatura entre 30-35 ° C promove a maior produção de ácido láctico (DECOCK e CAPPELLE, 2005). Além disso, a relação entre as BALs homo e hetero-fermentativo e o tipo de levedura e a densidade celular também influenciam fortemente no valor do QF (CORSETTI, 2013).

A produção de ácidos orgânicos pelas BALs também é responsável pelo aumento da acidez titulável (ATT) e redução do pH da massa. O valor de ATT é uma medida do total de ácidos orgânicos sintetizados durante a fermentação da massa (BRANDT, 2007). Na Figura 1 (a e b), é possível ver que os resultados da ATT estão inversamente correlacionados ao pH. No 1º dia de fermentação o resultado da ATT foi semelhante ao dia da inoculação (0 dia) e o pH apresentou uma ligeira redução de 6,20 (0 dia) para 5,65 (1º dia). Mas, ao final do 3º dia de fermentação, o valor de ATT teve um aumento significativo ( $p < 0,5$ ), atingindo 17,92 mL NaOH 0,1N 10 g<sup>-1</sup> de massa, no mesmo período em que o pH apresentou uma diminuição significativa ( $p < 0,5$ ) (6,20 - 3,94). Entre o 3º e o 9º dia de fermentação, o pH apresentou uma leve e não significativa oscilação ( $p > 0,5$ ) (3,94 - 3,70). O mesmo resultado foi observado para ATT, que variou de 17,92 a 20,80 mL NaOH 0,1N 10g<sup>-1</sup> de massa, não demonstrando diferença significativa ( $p > 0,5$ ). Os valores de ATT obtidos neste trabalho são semelhantes aos observados por Kim *et al.* (2009); 22 mL de NaOH 0,1N 10g<sup>-1</sup> de massa, em massa de trigo integral fermentada por 36h. As cinzas da farinha atuam como tampão, permitindo que as BALs fermentem por períodos mais longos sem serem suprimidas (SALOVAARA e VALJAKKA, 1987), liberando mais ácidos orgânicos na massa e aumentando a ATT. Portanto, a massa fermentada produzida com farinha de trigo integral pode apresentar maior valor de ATT e menor pH, justificando os resultados de ATT para massa de trigo integral neste trabalho.

### 2.3.2 Perfil de voláteis durante a fermentação

A Tabela 2 apresenta o perfil dos compostos voláteis encontrados ao longo da fermentação de 9 dias do *sourdough*, com suas respectivas características de odores.

TABELA 2 - PERFIL DE VOLÁTEIS (ÁREA PERCENTUAL), DISTRIBUÍDOS DE ACORDO COM A CLASSE QUÍMICA, EM *SOURDOUGH* DE FARINHA DE TRIGO INTEGRAL AO LONGO DA FERMENTAÇÃO DE NOVE DIAS COM SUAS RESPECTIVAS CARACTERÍSTICAS DE ODOR.

continua

Composto	TR (min)	0 dia	1º dia	3º dia	5º dia	7º dia	9º dia	Odor
<b>Álcoois</b>								
2,3-Butanediol	3,787	nd	62,22	21,62	nd	nd	nd	Fruta, Creme, Manteiga
1-Hexanol	6,175	40,72	7,28	12,62	9,06	9,85	6,85	Álcool, Verde, Fruta, Doce, Floral Madeira,
2-Hepten-1-ol (E)	9,570	nd	nd	1,00	nd	nd	nd	Gordura, Pungente, Plástico, Verde
2-methyl 1-Butanol	9,592	5,57	1,32	nd	2,63	2,72	1,87	Tostado, Vinho, Cebola, Fruta
1-Heptanol	9,599	nd	nd	nd	1,64	0,86	0,61	Folha, Grama Madeira, Violeta, Doce
2-Octen-1-ol (Z)	10,430	nd	nd	6,16	8,77	4,07	nd	Doce, Floral
2-ethyl 1-Hexanol	11,00	3,22	0,05	nd	nd	nd	0,67	Ácido, Fresco, Floral, Óleo, Doce
2-propil-1-Pentanol	11,005	nd	nd	nd	nd	nd	3,48	Verde, Óleo, Fermentado
3,6-diol-4-octil-	11,062	nd	0,56	nd	nd	nd	nd	nf
2,6-dimetil - 4-heptanol,	11,627	nd	nd	nd	2,15	nd	2,65	Etéreo
2-Decen-1-ol	11,844	nd	nd	nd	nd	6,18	2,38	Gordura
1-Octanol	11,887	nd	nd	nd	7,41	3,49	2,43	Terra, Mofado
2- feniletílico Álcool	12,723	nd	nd	nd	9,86	18,41	9,43	Rosa, Mel
(1,1-dimetiletil) 4-cis Ciclo-hexanol	12,727	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nf
1-Nonanol	13,730	nd	nd	nd	nd	nd	2,01	Gordura, Floral, Rosa, Laranja
Etanol	14,042	nd	2,97	1,91	1,40	1,27	1,52	Álcool, Etéreo
2-Decen-1-ol (E)	14,304	2,03	nd	nd	nd	nd	nd	Gordura
<b>Área percentual</b>	<b>-</b>	<b>51,54</b>	<b>74,40</b>	<b>43,31</b>	<b>42,92</b>	<b>46,85</b>	<b>33,90</b>	
<b>Aldeído</b>								
Hexanal	4,015	13,84	2,08	3,60	nd	nd	1,27	Fresco, Verde, Gordura, Fruta Doce, Grama, Aldeídico

continua								
Composto	TR (min)	0 dia	1º dia	3º dia	5º dia	7º dia	9º dia	Odor
Benzaldeído	11,346	nd	nd	3,18	nd	nd	nd	Amêndoas, Forte, Doce, Amargo, Cereja
2-Octenal (E)	11,634	nd	nd	2,68	nd	nd	nd	Verde, Fat, Banana, Doce, Noz, Tostado, Cereal
Nonanal	12,537	4,50	nd	1,13	nd	nd	1,62	Aldeídico, Rosa, Ácido, Verde, Floral
Decanal	14,299	nd	nd	nd	2,57	0,89	0,98	Doce, Aldeídico, Ácido, Floral
4-Decenal (E)	15,950	nd	nd	nd	2,06	2,09	nd	Aldeídico
<b>Área percentual total</b>	-	<b>18,34</b>	<b>2,08</b>	<b>10,59</b>	<b>4,63</b>	<b>2,98</b>	<b>3,87</b>	
<b>Alcanos</b>								
2,2,6-trimetil-Octane	9,243	5,22	0,58	2,81	1,03	nd	0,42	nf
Decane	9,586	nd	nd	nd	nd	3,34	nd	Gasolina
2,2,4-trimetil Hexane	9,811	4,90	0,48	nd	nd	nd	nd	nf
3-etil, 2-metil, 1,3 Hexadiene	11,573	nd	nd	nd	nd	nd	1,49	nf
Metil heptane	11,590	nd	nd	nd	nd	nd	0,91	nf
3-etil- 3-4,6-dimetil Dodecane	11,592	8,59	nd	nd	nd	nd	1,15	Alcano
2,4-dimetil Eicosane	15,168	1,55	nd	nd	nd	nd	nd	nf
2,6,10,15 tetrametil Heptadecane,	15,413	2,27	nd	nd	nd	nd	nd	nf
Farnesane (2,6,10-trimetil Dodecane)	15,414	nd	nd	nd	nd	nd	0,56	Maça Verde
<b>Área percentual total</b>	-	<b>22,53</b>	<b>1,06</b>	<b>2,81</b>	<b>1,03</b>	<b>3,34</b>	<b>4,53</b>	
<b>Ácido carboxílico</b>								
Ácido butanóico (ácido butírico)	3,695	nd	11,39	8,42	nd	nd	nd	Queijo, Ácido Manteiga, Fruta, Doce, Parmesão
(L) ácido láctico	6,748	nd	nd	10,82	nd	nd	nd	Odor desagradável
Ácido hexanoico	9,878	nd	3,30	10,70	7,59	6,23	5,16	Ácido, Queijo Gordura, Doce
Ácido octanóico	13,712	nd	nd	4,85	nd	nd	2,06	Gordura, Queijo Ranço,
<b>Área percentual total</b>	-	<b>0,00</b>	<b>14,69</b>	<b>34,79</b>	<b>7,59</b>	<b>6,23</b>	<b>7,22</b>	
<b>Ésteres</b>								
Lactato de etila	4,359	nd	nd	3,84	24,31	25,66	26,87	Manteiga,



(Éster etílico do ácido láctico)								Creme, Coco
								conclusão
Composto	TR	0 dia	1º dia	3º dia	5º dia	7º dia	9º dia	Odor
Acetato de isoamilo (Ácido isopentílico éster acético)	6,513	nd	nd	nd	nd	2,74	5,15	Banana, Pera
Éster etílico do ácido valérico (Éster etílico do ácido pentanóico)	8,156	nd	nd	nd	nd	nd	0,89	Fruta
Éster ciclopentílico do ácido 4-etilbenzóico	8,304	nd	nd	nd	nd	nd	3,41	nf
Acetato de amila (Éster pentílico de ácido acético)	8,589	nd	nd	nd	nd	3,76	3,82	Fruta, Banana, Pera, Maça
Octanoato de etila (Éster etílico do ácido octanóico)	14,146	nd	nd	nd	5,86	1,47	1,97	Fruta, Vinho, Damasco, Banana
Butirato de metila (Éster metílico do ácido butanóico)	16,164	nd	nd	1,84	7,69	3,44	2,01	Fruta (Maça, abacaxi)
Palmitato de metila (Éster etílico do ácido hexadecanóico)	23,763	nd	nd	nd	4,26	2,97	nd	Fruta
<b>Área percentual total</b>	-	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>5,68</b>	<b>42,12</b>	<b>40,4</b>	<b>44,12</b>	
<b>Cetona</b>								
2,3 (H) furano-di-hidro-5-pentil	16,692	nd	nd	nd	1,71	0,56	0,84	Coco
<b>Área percentual total</b>	-	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>1,71</b>	<b>0,56</b>	<b>0,84</b>	
<b>Outros</b>								
1,3 Diisopropoxi-1,3-dimetil-1,3-isilaciclobutano	3,847	6,14	nd	nd	nd	nd	nd	nf
Ciclopentene, 1-butil	11,048	1,45	nd	2,82	nd	nd	nd	nf
2,5 Dihidroxibenzaldeí do 2TMS derivado	13,155	nd	nd	nd	nd	nd	3,39	nf
2-Metoxi-4-vinilfenol	16,001	nd	7,77	nd	nd	nd	nd	Maça, apimentado, Amendoim, Vinho
4 Etill-3-nonen-5-yne	16,540	nd	nd	nd	nd	nd	2,13	nf
<b>Área percentual total</b>	-	<b>7,59</b>	<b>7,77</b>	<b>2,82</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>5,52</b>	

TR= Tempo de Retenção em minutos; nd = não detectado; nf= não encontrado na literatura

Os compostos voláteis encontrados no *sourdough* são produzidos durante a fermentação pelas leveduras e pelas BALs através de reações biológicas e transformações bioquímicas, contribuindo para o sabor do produto. O *sourdough* é caracterizado pela presença de vários compostos voláteis responsáveis pelo aroma, que variam de acordo com a microbiota autóctone e a origem da farinha utilizada (RIPARI, CECCHI, *et al.*, 2016).

Antes da fermentação, 13 diferentes compostos voláteis, álcoois, aldeídos e alcanos foram identificados na massa. Aldeídos e álcoois representavam 69% dos compostos encontrados, com predomínio do 1-hexanol e hexanal, respectivamente. A presença de aldeídos lineares indica a oxidação degradativa dos ácidos graxos e dos álcoois correspondentes (BORGES *et al.*, 2007).

Já no primeiro dia de fermentação foram observados o aumento da classe de álcoois e a formação de ácidos carboxílicos, indicando a atividade das leveduras e das BALs. O álcool 2,3 butanodiol (2,3-BD) foi encontrado principalmente no 1º dia de fermentação, apresentando redução no 3º dia e não mais sendo identificado no 5º dia. O 2,3-BD pode ser metabolizado em diferentes compostos pelas reações de desidratação, desidrogenação, cetalização, esterificação de enzimas. Além disso, as bactérias do ácido acético também podem oxidar o 2,3-BD para formar acetoína e diacetil, que podem ser usadas por bactérias e leveduras para formar novos produtos (ROMANO A. *et al.*, 2002).

Os ácidos carboxílicos são liberados pelas BALs durante o metabolismo dos carboidratos. No 3º dia foi identificada a maior variedade dos ácidos carboxílicos, como ácido láctico, ácido hexanóico, ácido octanóico, indicando a atividade das BALs e confirmando o crescimento cinético (Figura 1). Alguns ácidos orgânicos como o ácido hexanóico e butanóico são produzidos pela síntese de ácidos graxos pela malonil coenzima A. Outra via possível é a via biossintética de aminoácidos, na qual a oxidação dos aldeídos formados na via de *Ehrlich* libera os ácidos orgânicos correspondentes (BERRY e WATSON, 1987)]. O ácido hexanóico foi o único ácido carboxílico produzido durante todo o processo de fermentação. Ripari *et al.* (2006a) observaram a presença de

ácido hexanóico na massa fermentada por *L. plantarum*, BAL encontrada na farinha utilizada em seu trabalho (apêndice A).

Por outro lado, o principal ácido carboxílico presente no 1º dia foi o ácido butanóico que tem uma influência negativa no aroma do pão por estar associado a odor de ranço (HANSEN e HANSEN, 1996). Entretanto, no 5º dia de fermentação, apenas o éster correspondente (butirato de metila) com odor frutado foi identificado.

Os ésteres podem ser formados por esterificação dos ácidos carboxílicos e pelas acetiltransferases, entre acetil coenzima A derivados de ácidos graxos (C6-C10) e álcoois (principalmente o etanol) (BIRCH *et al.*, 2014), concordando com os resultados da Tabela 2 que mostram a diminuição de compostos alcoólicos com respectivamente aumento do composto de ésteres a partir do 3º dia de fermentação.

Entre o 3º e o 5º dia, houve redução dos aldeídos e dos ácidos carboxílicos, mas do 3º ao 7º dia o álcool, aldeído, ácidos carboxílicos e ésteres mostraram-se praticamente estáveis. Ao final do processo de fermentação foram encontrados 31 compostos voláteis, sendo os ésteres com odores florais e frutados e alguns álcoois aromáticos, como o álcool 2-feniletílico e o 2-metil-1-butanol, com odores de vinho e frutas, respectivamente, presentes. Além disso, houve a redução de alguns compostos como o 1-Hexanol e o Hexanal com odor de grama verde (Tabela 2).

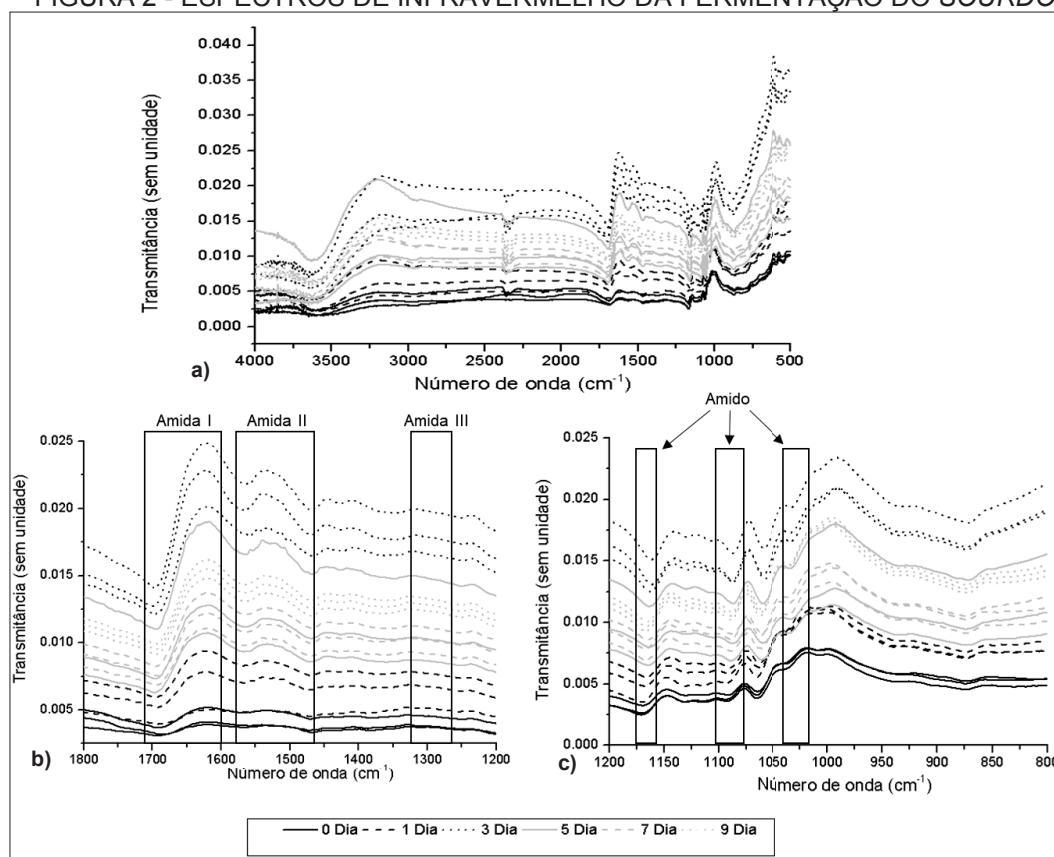
Em geral, altas quantidades de álcoois, cetonas, ésteres, ácidos e aldeídos contribuem positivamente para o aroma do pão de trigo (BIRCH *et al.*, 2014). Estes resultados mostram que a fermentação natural contribui para a formação de aromas mais delicados com odores frutados e florais, produzindo um aroma complexo, devendo ser destacado que as mudanças no perfil volátil da massa durante as propagações são essenciais para a obtenção uma massa estável

### 2.3.3 FTIR e Análise de Componentes Principais (PCA)

Os espectros de FTIR de todas as amostras (0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias de fermentação) em triplicata são mostrados na Figura 2.

O pico mais alto foi observado na região  $3600\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ , indicando a presença de compostos com ligações O-H, como álcoois, ácidos carboxílicos e água. O resultado era esperado visto que o *sourdough* possui uma grande quantidade de água. Portanto, nos espectros de FTIR do *sourdough*, as regiões dos polissacarídeos e das proteínas, especialmente do glúten, são as mais importantes. A região dos polissacarídios está entre  $800\text{ e }1200\text{ cm}^{-1}$ . A banda característica do amido é mais intensa entre  $1010\text{--}1020$ , já em  $1080\text{ e }1150\text{ cm}^{-1}$  estão as regiões atribuídas as vibrações de alongamento de C—O, e C—C ligação (WOLTER *et al.*, 2014). Durante os 9 dias de fermentação, não foram observadas grandes alterações na região dos polissacarídeos.

FIGURA 2 - ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DA FERMENTAÇÃO DO SOURDOUGH



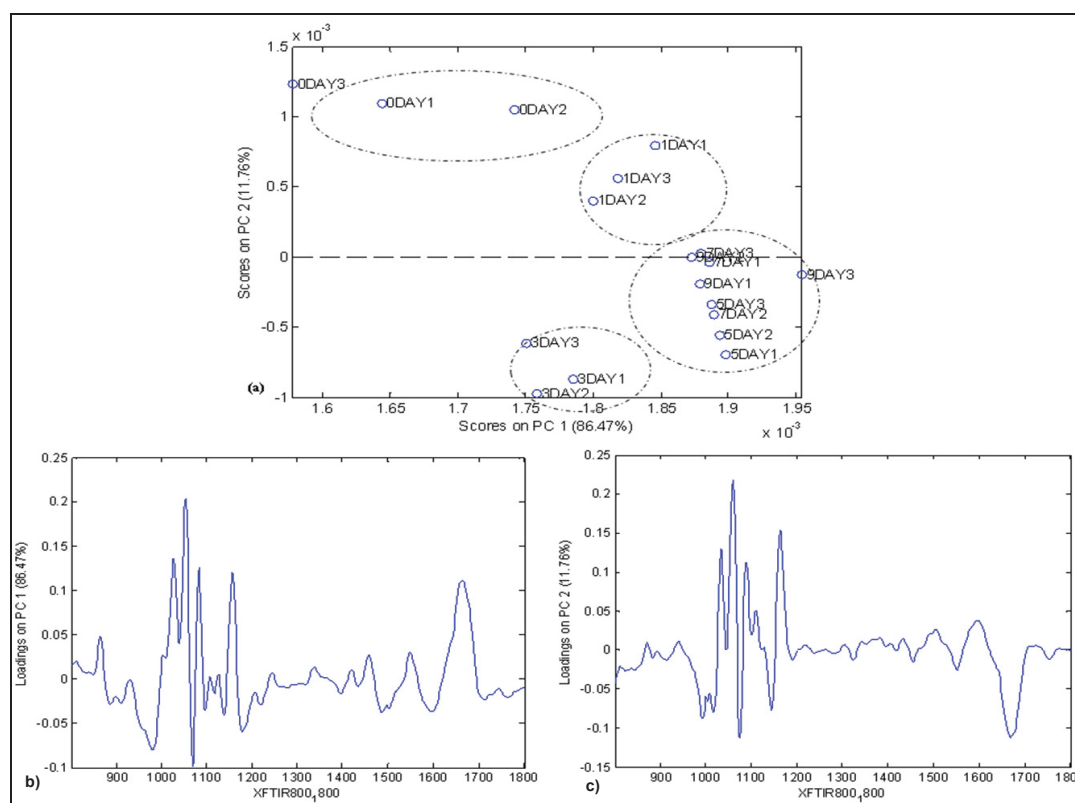
Espectros em triplicata, (a) na região espectral  $[4000\text{--}500]\text{ cm}^{-1}$ , (b) na amida I, II e III regiões  $[1800\text{--}1200]\text{ cm}^{-1}$  região espectral (região do glúten), (c) na região espectral dos polissacarídeos da região  $[1200\text{--}800]\text{ cm}^{-1}$ .

No entanto, a principal modificação foi observada na região do glúten, que inclui as bandas da amida I ( $1600\text{--}1690$ ), II ( $1480\text{--}1580$ ) e III ( $1230\text{--}1300$ ) (CZAJA *et al.*, 2016). A amida I é a mais importante, pois está relacionada ao

alongamento das vibrações das ligações peptídicas C=O, fornecendo informações sobre as estruturas secundárias das proteínas. A amida II, por sua vez, fornece informações sobre o N-H *flexus* (40-60% de energia potencial) e vibração (C-N) (18-40%), mostrando uma menor sensibilidade à estrutura conformacional (KADDOUR *et al.*, 2008). As amidas I, II e III (1200-1800) estão destacadas na Figura 2 (C). Os picos de Amida I e II tornam-se mais evidentes a partir do 3º dia, mostrando modificações no glúten estrutural já nos três primeiros dias de fermentação.

Foi realizado a análise de PCA usando o espectro de regiões de 800-1800  $\text{cm}^{-1}$  para avaliar se as mudanças nas regiões de glúten e polissacarídeo durante a fermentação são perceptíveis. A Figura 3 mostra os gráficos de *loading* e *score plots* das duas componentes principais (PCs), que juntos explicam 98,23% da variação nas regiões de polissacarídeo e glúten de todas as amostras.

FIGURA 3: ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DOS ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DE 0, 1, 3, 5, 7 E 9 DIAS DE FERMENTAÇÃO DO SOURDOUGH



a) gráfico de pontuação do PCA nos dois primeiros fatores (PC1 e PC2); b) carregamentos para PC1; c) carregamentos para PC2.

Com base na análise de PCA, todas as amostras foram classificadas positivamente na PC1, sendo principalmente identificadas pelas bandas do amido ( $1050\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ ). O eixo positivo do PC2 foi positivamente correlacionado com a banda do amido e de outros polissacarídeos ( $1020$  e  $1169\text{ cm}^{-1}$ ). O eixo negativo do PC2 foi caracterizado pelas bandas da amida I ( $1674\text{ cm}^{-1}$ ) e dos polissacarídeos ( $1070\text{ cm}^{-1}$ ).

Os scores PC1xPC2 (Figura 3 [a]) mostram 4 *clusters* diferentes, separando as amostras em 0, 1 e 3 dias das demais, respectivamente. Estes resultados indicam que as principais mudanças no glúten e no amido ocorrem nos primeiros três dias de fermentação. Os *clusters* 1 e 2 estão no eixo positivo da PC1 e da PC2, e são portanto, explicados principalmente pela região do amido. No entanto, o *cluster* 3 está localizado na região positiva do PC1, mas negativa do PC2. Esta região corresponde à amida I, indicando que modificações importantes da estrutura secundária do glúten ocorreram no 3º dia. O aumento da acidez na massa resulta em alterações estruturais do glúten devido ao aumento das repulsões eletrostáticas intermoleculares, causando divisão das proteínas do glúten e maior exposição dos grupos hidrofóbicos (CLARKE *et al.*, 2004). O pH mais baixo também é essencial para o desempenho das enzimas de farinha e para a modificação das ligações do glúten. No 3º dia, o pH diminuiu rapidamente e as concentrações de ácido orgânico aumentaram aproximadamente oito vezes. O pH é estritamente associado à fermentação BALs (SIEPMANN *et al.*, 2018). Assim, presume-se que, neste momento, a população BALs tornou-se predominante em relação aos outros micro-organismos não adequados para panificação presentes na farinha, concordando com os resultados dos compostos voláteis.

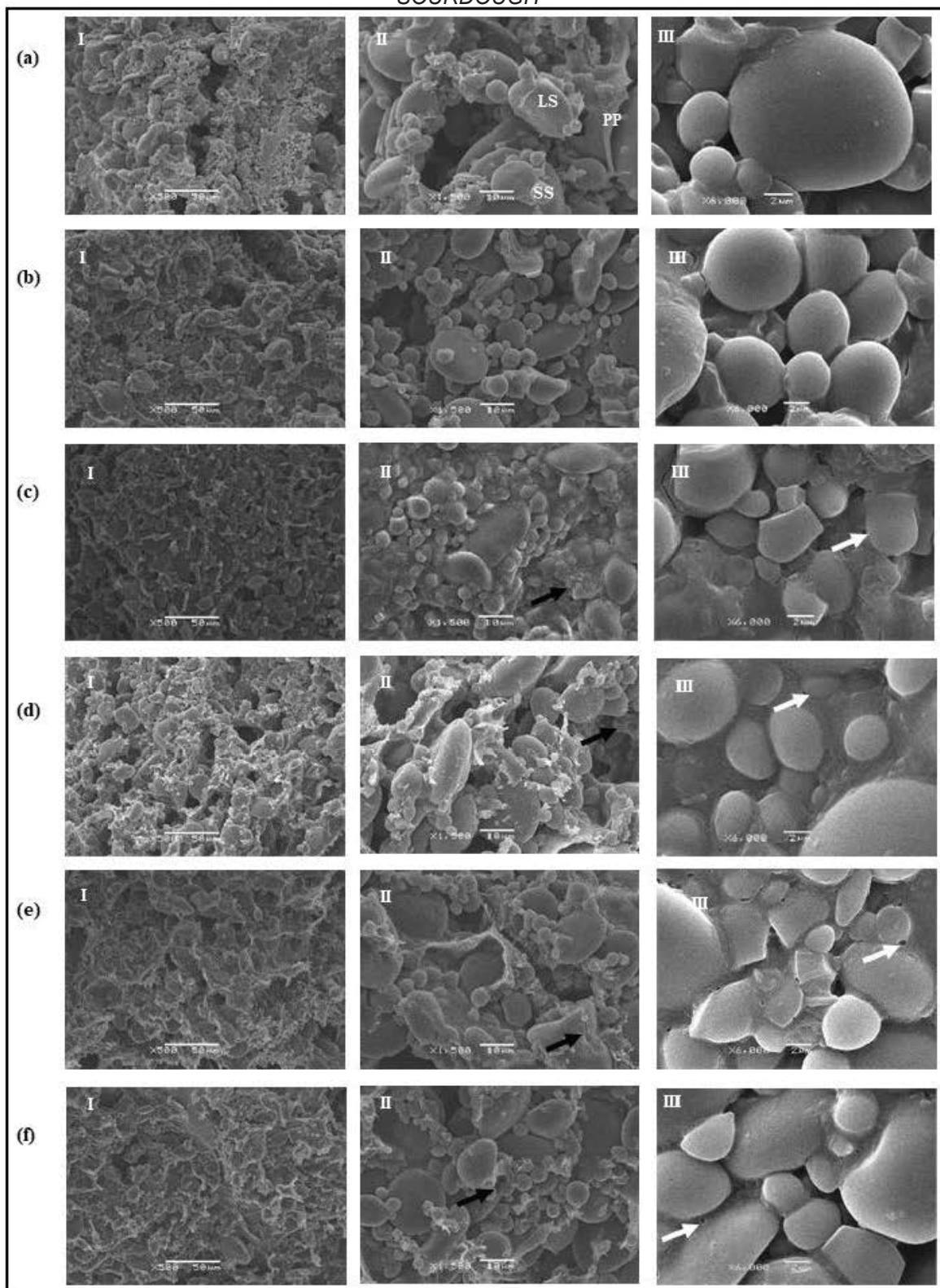
Já a partir do 3º dia de fermentação, a massa fermentada se torna mais estável, e não há grandes alterações nas regiões de glúten e amido e, portanto, através da análise de PCA, essas amostras são agrupadas no mesmo cluster.

#### 2.3.4 Observação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do *sourdough*

As imagens do *sourdough* após 0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias de fermentação são apresentadas na Figura 4.



FIGURA 4 - MICROGRAFIAS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DO SOURDOUGH



(a) 0 dia; (b) 1 dia; (c) 3 dia; (d) 5; dia; (e) 7 dia e (f) 9 dias de fermentação com aumento de 500x (I), 1500x (II) e 6000x (III). LS: grânulo de amido lenticular grande; SS: grânulo pequeno e esférico; P: proteína; setas brancas: bolhas de CO<sub>2</sub>; setas pretas: grânulos de amido com deformações

A Figura 4 mostra as imagens do MEV de 0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias de fermentação. No dia 0 [Figura 4 (a)] a massa apresentou grandes grânulos lenticulares de amido (LS) e grânulos pequenos e esféricos (SS) distribuídos pela proteína (P). Esta observação concorda com os estudos relatados por Aponte *et al.* (2014) e Kim *et al.* (2009) em *sourdough*. Os grânulos apresentavam formas uniformes e lisas, com diâmetros entre 3,6 e 27,0  $\mu\text{m}$ , muito visíveis, caracterizando-se como massa compacta de glúten e grânulos de amido. Essas características concordaram com os resultados obtidos por Aponte *et al.* (2014).

Entre o 1º dia até o final da fermentação [Figura 4 (b) - (f)], os grânulos de amido grandes e pequenos tinham diâmetros menores (1,63 a 23,5  $\mu\text{m}$ ) e menos uniformes. O aumento na quantidade dos pequenos grânulos pode ser explicado pela hidrólise dos grânulos de amido e carboidratos complexos por enzimas de farinha e amilases microbianas (MINERVINI *et al.*, 2014). Na Figura 4 são observados grânulos de amido [b - f (II)] com deformações na superfície (identificadas pelas setas pretas), que são formadas pelo ataque das enzimas amilases (KIM *et al.*, 2003). As amilases atuam tanto nos grânulos de amido danificados quanto na matriz do glúten, formando uma rede mais organizada com forte adesão entre o amido e o glúten (MEDCALF, 1968).

A formação da rede mais compacta do glúten e do amido foi obtida a partir do 1º dia, com os grânulos de amido estando mais cobertos pela matriz do glúten. Além disso, um aumento nas ligações dos pequenos grânulos de amido foi observado. Devido à fermentação, o meio tornou-se mais ácido, aumentando a solubilidade das proteínas do glúten, hidrolisando os grandes agregados de glúten em uma rede menor. A hidrólise do glúten deve ser moderada para gerar uma massa com menor elasticidade, maior extensibilidade e mais estável, capaz de reter o  $\text{CO}_2$  produzido. As bolhas de  $\text{CO}_2$  tornaram-se mais evidentes nas imagens com aumento de 6000x (identificadas pelas setas brancas), que foram vistas até o final da fermentação, mostrando que as alterações observadas no glúten não afetaram a capacidade de retenção do  $\text{CO}_2$  produzido.



## 2.4 CONCLUSÕES

Em conclusão, esta é a primeira vez que a evolução dos compostos voláteis e das modificações nas estruturas do glúten e do amido são mostradas durante o processo de fermentação do *sourdough*. Com este estudo é possível confirmar que a massa fermentada tradicional, obteve a estabilização dos parâmetros bioquímicos, estruturais e tecnológicos após cinco dias de fermentação.

Investigações futuras na avaliação da concentração de glúten durante a fermentação e produção de pão com análise de parâmetros tecnológicos são etapas essenciais na exploração do *sourdough* brasileiro e na compreensão dos processos bioquímicos envolvidos no processo de fermentação da massa fermentada.

**ARTIGO III****SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO PARA A PRODUÇÃO DE  
*SOURDOUGH* TIPO II: IMPACTO NO PERFIL MICROBIANO, BIOQUÍMICO E  
VOLÁTIL DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO**

## Resumo

Este estudo tem como objetivo investigar a cinética de crescimento de onze bactérias do ácido láctico (BALs) em *sourdough* tipo II por 24 horas e avaliar as características finais da massa. As amostras foram coletadas às 0, 6, 9, 12, 15, 18 e 24h para análises de crescimento microbiano, pH, acidez titulável e produção de CO<sub>2</sub>. O perfil volátil, a concentração de ácidos orgânicos e o quociente de fermentação (QF) foram analisados a cada 6h. Durante as primeiras 12h as BALs atingiram a fase estacionária, com a concomitante formação de ácidos orgânicos e carboxílicos, álcoois e ésteres. Ao final das 24h de fermentação, a concentração de leveduras variou de 2 log UFC g<sup>-1</sup> nas massas fermentadas por *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. fermentum* e *L. sakei* até 5 log (*L. jhonsonii*). Em relação ao QF, apenas o *Lactobacillus reuteri* atingiu o valor recomendado (2,46). Com relação aos compostos voláteis, *L. sakei* apresentou formação de ácido butanoico (composto indesejado). Já *L. brevis*, *L. amilovor*us, *L. reuteri* e *Pediococcus pentosaceus* mostraram características aromáticas desejáveis com produção adequada de ésteres, baixa concentração de álcoois e ácidos carboxílicos. Em conclusão, a *L. reuteri* teve o melhor desempenho, mas *L. amilovor*us, *L. brevis* e *P. pentosaceus* também são recomendados para uso em co-cultura de fermentação do *sourdough* tipo II.

### 3 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO PARA A PRODUÇÃO DE *SOURDOUGH* TIPO II: IMPACTO NO PERFIL MICROBIANO, BIOQUÍMICO E VOLÁTIL DURANTE O PROCESSO FERMENTATIVO

#### 3.1 INTRODUÇÃO

Os produtos de panificação são os alimentos mais consumidos no mundo (EDWARDS, 2007). A qualidade destes produtos, principalmente do pão, é normalmente definida de acordo com o seu volume, textura, cor e sabor (Guinet e Godon 1996). Uma das maneiras de aumentar a qualidade desses produtos é através do *sourdough*, uma massa fermentada pelas bactérias do ácido láctico (BAL) e leveduras.

O *sourdough* pode ser classificado em quatro tipos diferentes, de acordo com a metodologia de produção aplicada. O tipo I é conhecido pela fermentação lenta realizada pela microbiota presente na farinha, água e ar. Diferentemente, a fermentação do tipo II é mais rápida (15-24h) devido à adição da cultura iniciadora (BAL com ou sem levedura). Já o tipo III é produzido pela desidratação da massa tipo II. O tipo IV ou *sourdough* misto é caracterizado pela adição da cultura iniciadora ou inóculo, mas fermentado lentamente (HAMMES e GÄNZLE, 1998; NIONELLI *et al.*, 2014; SIEPMANN *et al.*, 2018).

O *sourdough* tipo I é o mais produzido e estudado e deve-se destacar que esta massa apresenta um ecossistema microbiano único e características distintas, devido às variações na microbiota e às características do substrato utilizado (SIEPMANN *et al.*, 2018). Por outro lado, visando a padronização do produto final, o tipo II é o mais recomendado, já que o crescimento da microbiota autóctone pode ser suprimido ou inibido pela cultura iniciadora, a qual é adicionada em alta concentração (HUYS *et al.*, 2013).

O *sourdough* é um ecossistema complexo em que as BALs e leveduras podem agir sinergicamente ou de forma antagônica devido à competição por substrato (DE VUYST *et al.*, 2009). O gênero *Lactobacillus* é classificado como heterofermentativo, homofermentativo, heterofermentativo ou facultativo obrigatório. As BALs homofermentativas fermentam apenas hexoses através da via EMP (*Embden-Meyerhof-Parnas*) produzindo ácido láctico. As heterofermentativas obrigatórias fermentam hexoses e pentoses através da via

6-PG/PK (6-fosfogluconato / fosfoquetolase) liberando concentrações equimolares de ácido láctico, ácido acético e/ou etanol e CO<sub>2</sub>. Enquanto os BALs heterofermentativas facultativas fermentam tanto as hexoses através da via EMP, como as pentoses e gluconato através da via 6-PG / PK (HAMMES e VOGEL, 1995).

Devido à produção de ácido láctico e acético, ocorre a acidificação da massa e consequentemente a redução do pH, causando a hidrólise do amido, degradação do glúten e produzindo uma massa com maior elasticidade e umidade interna (CLARKE *et al.*, 2004; CORSETTI, 2013). Além disso, o aumento da acidez favorece o crescimento da levedura, aumenta a concentração de compostos voláteis (MAKHOUL *et al.*, 2015), produção de CO<sub>2</sub>, vida de prateleira (HAMMES e GÄNZLE, 1998; POUTANEN *et al.*, 2009; MANINI *et al.*, 2016). No entanto, o excesso na acidez é indesejável, uma vez que pode inibir o crescimento de leveduras autóctones e pode causar hidrólise excessiva do glúten. Portanto, a seleção das bactérias lácticas para serem usadas como culturas iniciadoras é uma etapa essencial na obtenção de um *sourdough* tipo II com boas qualidades tecnológicas.

Considerando a importância das BALs na fermentação do *sourdough*, este trabalho tem como objetivo avaliar a cinética de crescimento de onze BALs (*L. acidophilus*, *L. amilovorus*, *L. brevis*, *L. bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. jhonsonii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. sakei*, *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus*) em *sourdough* de trigo integral tipo II. As características do perfil aromático e parâmetros tecnológicos também foram avaliadas para selecionar bactérias potenciais a serem usadas como culturas iniciadoras na produção de *sourdough* tipo II.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 Culturas Iniciadoras

As BALs utilizadas como culturas iniciadoras foram: *Lactobacillus acidophilus* (NRRL B-4495), *L. amilovorus* (NRRL B-4540), *L. brevis* (NRRL B-4527), *L. fermentum* (NRRL B-1932), *L. jhonsonii* (NRRL B-2178), *L. reuteri* (NRRL B-14171), *L. sakei* (NRRL B-1917), e *P. acidilactici* (NRRL B-14958),

doadas pela ARS *Culture Collection* (NRRL), *L. bulgaricus* (CCT-0366) doada pela instituição André Tosello e *L. plantarum* e *P. pentosaceus* isoladas da farinha de trigo integral adquirida em mercado local. As BALs foram cultivadas por 48h a 35 °C em caldo *Man-Rogosa-Sharpe* modificado (MRSm) (10g de peptona, 8g de extrato de carne, 4g de extrato de levedura, 10g de glicose, 10g de maltose, 1g de tween 80, 2g de fosfato dibásico, 5g de acetato de sódio, 2 g de citrato de amônio, 0,2 g de sulfato de magnésio, 0,05 g de sulfato de manganês).

### 3.2.2 Preparação do *Sourdough*

As BALs foram centrifugadas a 5000 × g por 5 min, lavadas duas vezes em solução de Ringer e ressuspensas na mesma solução. A cultura iniciadora foi adicionada a uma concentração final média de  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup> à massa.

Cada 1kg de *sourdough* foi preparado com 500g de farinha de trigo integral comercial (72,8 ± 0,05 carboidratos totais; 12,7 ± 0,14 proteína; 10,7 ± 0,27 umidade; 2,1 ± 0,03 lipídios; 1,5 ± 0,18 cinzas) e 500g de água destilada estéril (rendimento da massa de 200 - RM = peso da massa x 100 / peso da farinha). Os *sourdoughs* foram incubados a 35 °C durante 24h.

### 3.2.3 Análises nos *sourdoughs*

As amostras foram coletadas a 0, 6, 9, 12, 15, 18 e 24h de fermentação para análises em triplicata de pH, acidez titulável (ATT), contagem em placa de BAL e levedura. Nestes mesmos tempos, a produção de CO<sub>2</sub> foi avaliada. As análises de quantificação de ácidos orgânicos (ácido acético e ácido láctico) e carboidratos (maltose, glicose, frutose e amido) foram realizadas em triplicata a cada 6h de fermentação. O quociente de fermentação (QF) foi determinado como a razão molar entre os ácidos láctico e acético.

#### 3.2.3.1 Análises de pH e ATT

O valor de pH de cada massa foi determinado por um pHmetro (modelo Luca-210, MS TecnoPON, São Paulo, Brasil) diluindo 10g da amostra em 90 mL de água destilada. A mesma amostra foi utilizada para determinação da acidez

total titulável (ATT) expressa como a quantidade (mL) de NaOH 0,1 N necessária para atingir o valor de pH de 8,5.

### 3.2.3.2 Produção de CO<sub>2</sub>

A geração de CO<sub>2</sub> como um resultado do aumento do volume da massa foi medida indiretamente usando a metodologia citada por Vernon-Carter et al. (VERNON-CARTER *et al.*, 2017) com modificações, registrando a variação no volume de cada 30 g de amostra em uma proveta graduada de 100 mL. Os resultados são apresentados como a variação percentual em relação ao volume inicial.

### 3.2.3.3 Análises microbiológicas

Para as contagens em placas, diluiu-se 10 g do *sourdough* em 90 mL de água peptona estéril (1% [p v<sup>-1</sup>] peptona e 0,9% [p v<sup>-1</sup>] NaCl). A amostra foi homogeneizada num *stomacher* (BagMixer® 400; Interscience, Saint Nom, França) por 2 min em velocidade máxima e submetida as diluições decimais seriadas. Para contagem das BALs, utilizou-se o meio MRS padrão, adicionado do antifúngico (ciclopiroxolamina 10 mg mL<sup>-1</sup>) e as placas foram incubadas em jarra de anaerobiose a 35 °C por 48h. Para a contagem de levedura totais, foi utilizado o meio *Dicloran Rose Bengal Chloramphenicol* (DRBC) com 1mg L<sup>-1</sup> de cloranfenicol (Himedia, Índia), as placas foram incubadas em meio aeróbio a 28 °C por 48-72h.

### 3.2.3.4 Quantificação dos ácidos orgânicos (ácido láctico e acético) e dos carboidratos (maltose, frutose e glicose e amido)

Os ácidos orgânicos (ácido láctico e acético) e os açúcares solúveis (maltose, glicose e frutose) foram quantificados por cromatografia líquida de alta resolução (UPLC; Waters, modelo Acquity, Brasil) com detecção do índice de refração (RI). A coluna utilizada foi a HPX-87H (300x7.8mm) a 50 °C, com a fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM no fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, o volume de amostra injetada foi de 10 µL. A extração dos compostos nas amostras foi realizada adicionando 1g da amostra em 1,0mL de água ultrapura e mantida em repouso

por 30 min. A solução foi centrifugada por 20min (3.493xg), resfriada em banho de gelo e filtrada através de filtros de nylon de 0,22 µm (Millipore). A quantificação do amido foi realizada de acordo com a metodologia de Fuwa (FUWA, 1954).

### 3.2.3.5 Identificação dos Compostos Voláteis

Os compostos voláteis foram identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa HS-SPME (Micro-Extração em Fase Sólida Head-Space; Shimadzu, modelo TQ8040, Japão) utilizando 5 g de massa. Cada amostra foi aquecida a 60 °C por 30min. A fibra SPME (Carboxen / Polidimetilsiloxano - CAR / PDMS) foi exposta ao *headspace* da amostra por 30 min, durante a etapa de extração, em seguida a fibra foi inserida imediatamente na porta injetora do Cromatógrafo para a dessorção térmica dos compostos voláteis a 260 °C por 5 min. Como gás de arraste foi utilizado o gás hélio com fluxo constante de 1 mL min<sup>-1</sup>. Para separação dos compostos voláteis foi utilizada uma rampa de aquecimento do forno. Primeiramente, a temperatura foi mantida a 60 °C por 5 min, em seguida programada a aumentar 5 ° C min<sup>-1</sup> até 260 °C e mantida a esta temperatura por 5 min e, finalmente a temperatura foi aumentada novamente a 5 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C. Os espectros de massa foram obtidos no modo de impacto de elétrons (70 eV), usando varredura completa com análise de massa na faixa m / z 30–400. A temperatura da linha de transferência foi estabelecida a 270 °C; a fonte de íões e o quadrupolo foram aquecidos por condução.

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

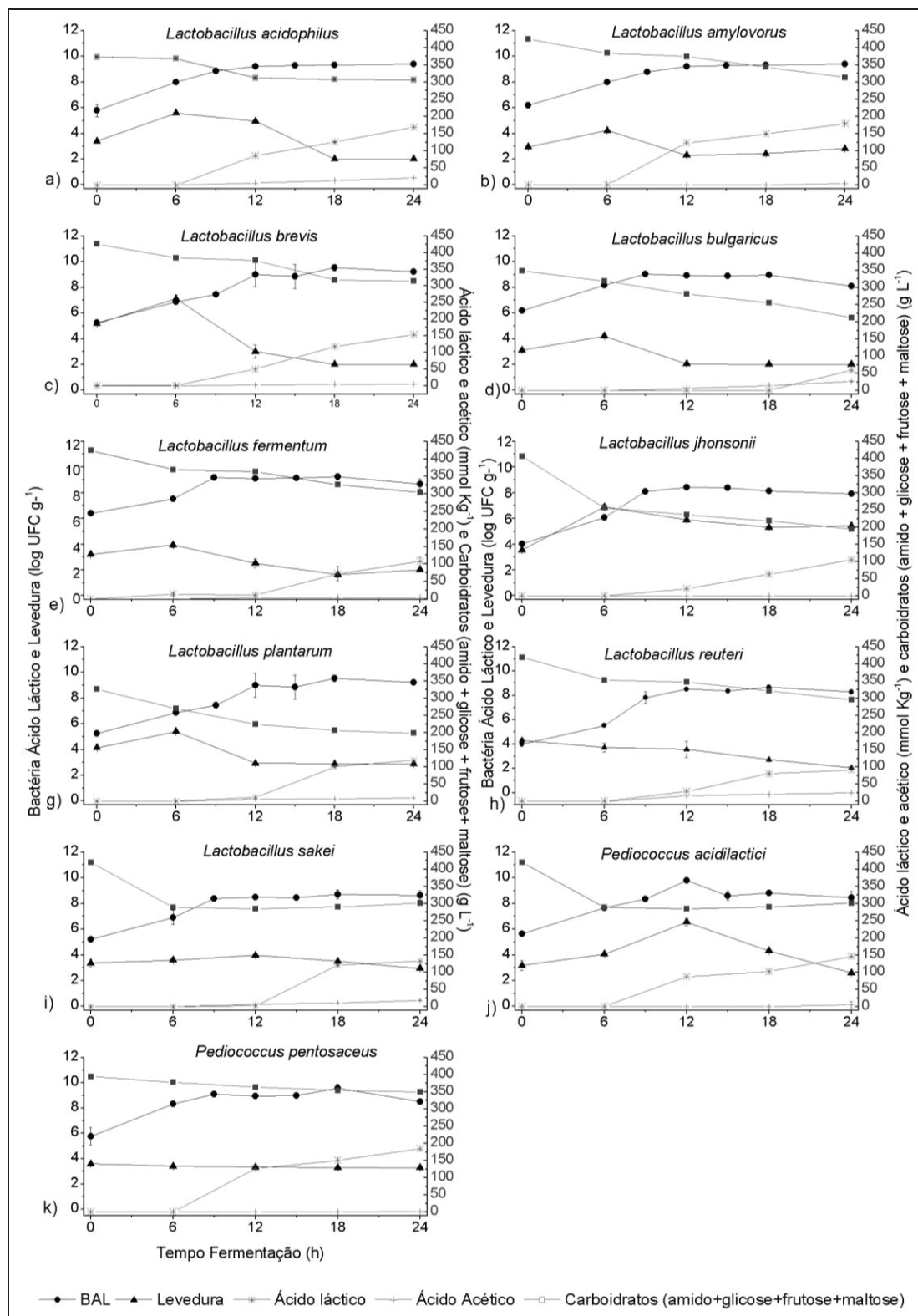
### 3.3.1 Cinética de crescimento

O *sourdough* é considerado um meio complexo devido a diversificação na microbiota autóctone e as características físico-químicas dos substratos utilizados. No *sourdough* tipo II a inoculação de culturas iniciadoras favorece o crescimento das BALs desejadas (SIEPMANN *et al.*, 2018).



As cinéticas de crescimento das 11 BALs avaliadas são apresentadas na Figura 1.

FIGURA 1 - CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS E LEVEDURA EM MASSA TIPO II DURANTE 24H DE FERMENTAÇÃO



Nas 11 cinéticas avaliadas, o inóculo inicial de BALs variou de 4,9 a 5,7 log UFC g<sup>-1</sup> (Figura 1), atingindo no final do processo uma ampla faixa de densidade celular 7,9 (*L. jhonsonii*) a 9,4 log UFC g<sup>-1</sup> (*L. acidophilus* and *L. amilovor*us). Durante o crescimento das BALs ocorre a produção de ácidos orgânicos e a redução do pH, o qual pode limitar o crescimento das próprias bactérias. Nas primeiras 12h de fermentação o pH de todas as massas reduziram de 6,20-6,42 para 3,61- 4,40 (Tabela 1), valores inferiores a faixa de pH ideal para o crescimento das BALs de 5,0-6,0 (GÄNZLE *et al.*, 1998; MESSENS *et al.*, 2002). Esta rápida redução do pH pode ter contribuído para que as BAL entrassem na fase estacionária já com 12h de fermentação. Ao final da fermentação (24h) as massas apresentaram pouca variação no valor de pH 3,55 a 3,78 (Tabela 1), permanecendo dentro da faixa ideal para *sourdough* (3,55 a 4,50) indicando uma fermentação bem desenvolvida (COLLAR *et al.*, 1994).

A redução do pH da massa é resultado da produção de ácidos orgânicos, como ácido acético e/ou láctico por meio da conversão de hexoses e/ou pentoses pelas BALs. A *L. fermentum* foi a bactéria que iniciou mais rapidamente a produção de ácido láctico na massa, obtendo a concentração de 13,44 mmol kg<sup>-1</sup> em 6 horas (Figura 1). Entretanto, a *L. bulgaricus* teve a fermentação mais lenta não apresentando ácido láctico até 18h, o que pode ter sido influenciado devido a temperatura de fermentação utilizada ser inferior ao ideal para a produção de ácido láctico por esta bactéria de 40 °C (HOFVENDAHL e HAHN-HÄGERDAL, 2000). As demais BALs estudadas iniciaram a produção de ácido láctico após as 6h de fermentação, atingindo concentrações de 2,56 mmol kg<sup>-1</sup> a 126,97 mmol kg<sup>-1</sup> em 12h.

A concentração de ácido láctico aumentou rapidamente a partir de 12h (com exceção para *L. bulgaricus*) alcançando valores de 91,52 a 184,49 mmol kg<sup>-1</sup> em 24h. A massa com a menor concentração de ácido láctico (91,52 mmol kg<sup>-1</sup>) apresentou a maior concentração de ácido acético (24,62 mmol kg<sup>-1</sup>). Esta massa foi fermentada pela *L. reuteri*, uma bactéria heterofermentativa e ácido-tolerante, frequentemente encontrada em *sourdough* tipo II (HAMMES e GÄNZLE, 1998; HUYS *et al.*, 2013).

TABELA 1 - RESULTADOS DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E TECNOLÓGICOS OBTIDOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DO SOURDOUGH TIPO II A 35 °C.

continua

Análises	TF (h) <sup>a</sup>	L. acid. <sup>b</sup>	L. amyl. <sup>c</sup>	L. brevis <sup>d</sup>	L. bulg. <sup>e</sup>	L. ferm. <sup>f</sup>	L. jhons. <sup>g</sup>	L. plant. <sup>h</sup>	L. reuteri <sup>i</sup>	L. sakei <sup>j</sup>	P. acidil. <sup>k</sup>	P. pent. <sup>l</sup>
ATT <sup>m</sup> (mL NaOH 10g massa <sup>-1</sup> )	0	4,22±1,73 a	4,34±1,47 a	4,03±1,18 a	3,81±0,86 a	4,08±1,11 a	3,73±1,03 a	4,20±1,31 a	2,87±0,03 a	3,95±1,48 a	4,04±1,76 a	3,88±1,39 a
	6	4,69±1,70 ab	5,09±0,69 ab	4,19±0,83 b	4,71±1,01 ab	4,43±1,32 ab	3,78±0,83 b	9,10±0,71 a	3,83±0,60 b	4,38±1,24 b	5,88±1,81 ab	5,24±1,48 ab
	9	6,91±0,44 b	14,76±1,06 a	11,77±0,10 a	12,46±1,35 a	11,77±0,67 a	6,32±0,25 b	14,56±0,05 a	6,97±0,74 b	14,04±0,21 a	13,89±0,41 a	13,60±1,98 a
	12	11,49±0,99 c	19,15±1,75 b	26,74±1,5 a	18,21±0,30 b	19,65±0,07 b	18,69±0,55 b	15,92±0,88 bc	17,27±1,23 bc	18,45±1,35 b	16,66±2,31 bc	18,54±0,47 b
	15	15,83±0,66 b	20,65±0,07 ab	26,22±1,58 a	19,93±1,03 b	20,18±0,42 b	19,51±1,71 b	17,78±1,68 b	19,37±0,04 b	19,28±1,81 b	18,56±1,21 b	20,44±2,03 b
	18	18,96±0,62 bc	22,01±1,00 abc	23,22±1,16 a	21,63±0,75 abc	23,72±0,10 a	22,71±1,73 ab	18,85±0,78 bc	19,71±1,29 ab	17,95±1,07 c	19,61±0,72 abc	20,68±0,12 abc
pH	24	21,81±0,54 ab	24,18±0,25 ab	24,69±1,60 ab	22,22±0,74 ab	27,45±1,49 a	24,26±2,64 ab	20,93±0,38 b	22,30±1,27 ab	22,65±1,91 ab	21,85±1,20 ab	21,56±1,6 ab
	0	6,40±0,03 ab	6,35±0,03 a,c	6,27±0,05 bcd	6,38±0,02 ac	6,39±0,03 ac	6,27±0,00 bcd	6,20±0,01 cd	6,38±0,05 ac	6,34±0,01 ac	6,21±0,01 d	6,42±0,00 a
	6	6,26±0,01 ab	5,85±0,07 e	6,20±0,00 bc	5,79±0,01 f	5,94±0,02 d	6,19±0,02 c	4,44±0,00 i	6,16±0,02 c	6,26±0,02 a	5,73±0,00 g	5,55±0,0 h
	9	5,59±0,01 a	4,43±0,01 c	4,09±0,01 e	3,87±0,02 g	4,17±0,03 d	5,09±0,03 b	3,91±0,00 g	5,11±0,01 b	4,00±0,01 f	3,86±0,02 g	3,94±0,02 fg
	12	4,40±0,00 a	3,82±0,00 d,e	3,61±0,01 g	3,74±0,00 f	3,87±0,00 bc	3,76±0,02 f	3,84±0,01 cd	3,90±0,00 b	3,77±0,00 ef	3,92±0,01 b	3,73±0,01 f
	15	4,05±0,01 a	3,70±0,01 d,f	3,63±0,01 h	3,71±0,00 cde	3,75±0,00 bd	3,67±0,01 efgh	3,76±0,01 bc	3,79±0,03 b	3,79±0,01 b	3,79±0,00 b	3,70±0,01 dg
	18	3,97±0,00 a	3,69±0,01 e,fg	3,67±0,01 efg	3,62±0,01 fg	3,61±0,01 g	3,63±0,00 fg	3,73±0,02 de	3,84±0,05 bc	3,85±0,00 b	3,78±0,01 cd	3,70±0,00 df
	24	3,77±0,00 a	3,62±0,00 c,d	3,63±0,00 c	3,65±0,02 c	3,57±0,01 de	3,55±0,01 e	3,66±0,00 c	3,74±0,01 ab	3,78±0,01 a	3,71±0,00 b	3,64±0,01 c

continua

Análises	TF (h) <sup>a</sup>	L. acid. <sup>b</sup>	L. amyl. <sup>c</sup>	L. brevis <sup>d</sup>	L. bulg. <sup>e</sup>	L. ferm. <sup>f</sup>	L. jhons. <sup>g</sup>	L. plant. <sup>h</sup>	L. reuteri <sup>i</sup>	L. sakei <sup>j</sup>	P. acidil. <sup>k</sup>	P. pent. <sup>l</sup>
Ácido Acético (mmol kg <sup>-1</sup> )	0	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
	6	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
	12	6,21±0,29 c	0,00±0,00 e	4,14±0,06 d	6,97±0,02 bc	4,10±0,00 d	0,00±0,00 e	6,36±0,03 c	16,12±0,03 a	7,08±0,00 b	0,00±0,00 e	0,00±0,00 e
	18	13,56±0,28 b	0,00±0,00 g	4,28±0,03 f	10,82±0,01 d	4,15±0,02 f	0,00±0,00 g	6,79±0,18 e	20,50±0,01 a	11,74±0,00 c	0,00±0,00 g	0,00±0,00 g
	24	21,56±0,11 b	4,40±0,17 e	4,93±0,01 e	20,85±0,81 b	4,30±0,01 e	0,00±0,00 f	9,66±0,015 d	24,62±0,00 a	18,35±0,49 c	6,03±0,1 1 <sup>e</sup>	1,50±0,01 f
Ácido Láctico (mmol kg <sup>-1</sup> )	0	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
	6	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	13,44±0,08 a	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b	0,00±0,00 b
	12	85,55±0,14 e	123,42±0,36 b	99,19±0,02 c	0,00±0,00 j	11,24±0,003 h	42,39±0,00 f	11,54±0,02 h	28,83±0,23 g	2,56±0,00 i	87,10±0,02 d	126,97±0,05 a
	18	125,85±0,93 b	149,27±0,85 a	117,80±0,25 c	0,00±0,00 i	72,52±0,84 g	84,81±0,35 f	62,72±0,29 h	60,52±0,14 h	96,91±0,28 e	102,61±0,1 d	150,59±0,04 a
	24	168,56±0,02 c	179,65±0,48 b	170,11±0,20 c	29,33±0,07 j	107,34±0,02 h	126,54±0,02 f	119,69±0,05 g	91,52±0,01 i	133,04±0,01 e	160,26±0,72 d	184,49±0,07 a
QF <sup>n</sup>	0	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
	6	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a	0,00±0,00 a
	12	9,22±0,92 b	0,00±0,00 e	15,99±0,04 a	0,00±0,00 e	1,82±0,00 c	0,00±0,00 e	1,21±0,01 cd	1,19±0,01 cd	0,24±0,00 de	0,00±0,00 e	0,00±0,00 e
	18	6,20±0,35 c	0,00±0,00 e	20,26±0,39 a	0,00±0,00 e	11,66±0,39 b	0,00±0,00 e	6,17±0,28 c	1,97±0,01 d	5,50±0,03 c	0,00±0,00 e	0,00±0,00 e
	24	5,21±0,05 de	27,31±2,24 b	21,35±0,02 b	1,46±0,08 e	16,65±0,07 bd	0,00±0,00 e	8,26±0,03 cde	2,48±0,00 e	4,84±0,26 e	17,69±0,57 bc	82,36±7,70 a
Maltose (g L <sup>-1</sup> )	0	14,79±0,06 f	15,25±0,28 d	15,54±0,11 bc	14,98±0,02 e	15,80±0,08 a	15,50±0,05 c	15,30±0,06 d	15,62±0,08 bc	15,02±0,05 e	15,70±0,02 ab	15,65±0,15 bc
	6	15,62±0,03 a	15,01±0,12 a	15,23±0,06 a	8,77±0,05 c	8,98±0,07 c	8,03±0,02 d,e	8,95±0,04 <sup>c</sup> c	7,87±0,02 e	8,66±0,01 c,d	14,21±0,03 b	14,09±0,02 b

Análises	TF (h) <sup>a</sup>	L. acid. <sup>b</sup>	L. amyl. <sup>c</sup>	L. brevis <sup>d</sup>	L. bulg. <sup>e</sup>	L. ferm. <sup>f</sup>	L. jhons. <sup>g</sup>	L. plant. <sup>h</sup>	L. reuteri <sup>i</sup>	L. sakei <sup>j</sup>	P. acidil. <sup>k</sup>	conclusão P. pent. <sup>l</sup>
Maltose (g L <sup>-1</sup> )	12	16,19±0,15 b	16,71±0,19 b	18,82±0,05 a	10,41±0,06 c	13,08±0,14 c	9,53±0,07 c	9,72±0,04 c	9,79±0,05 c	9,93±0,02 c	16,89±0,02 b	16,61±0,66 b
	18	12,34±0,25 b	14,97±0,17 a	14,97±0,06 a	10,81±0,03 c	8,31±0,04 e	9,02±0,02 d,e	9,73±0,01 d	5,69±0,01 f	11,19±0,01 c	15,21±0,21 b	12,51±0,02 b
	24	12,82±0,60 a	11,04±0,18 ab	11,89±0,16 ab	11,50±0,05 a,b	8,17±0,02 c	8,23±0,02 c	9,98±0,06 b,c	3,69±0,02 <sup>d</sup>	12,75±0,04 a	12,36±0,71 a,b	11,40±0,35 a,b
Glicose (g L <sup>-1</sup> )	0	8,73±0,51 k	9,56±0,14 e	9,92±0,09 a	8,95±0,07 j	9,70±0,08 d	9,75±0,03 c	9,85±0,03 b	9,35±0,12 f	9,00±0,03 i	9,25±0,06 g	9,15±0,08 h
	6	10,74±0,92 a	11,22±0,23 a	10,93±0,19 a	5,88±0,04 bc	7,80±0,06 b	5,19±0,07 c	6,30±0,01 bc	5,49±0,05 bc	5,89±0,12 bc	10,94±0,10 a	10,59±0,02 a
	12	16,01±0,53 a	14,84±0,11 a	15,17±0,02 a	7,30±0,02 b	14,35±0,15 a	7,31±0,02 b	7,15±0,17 b	8,19±0,06 b	7,39±0,15 b	15,67±0,07 a	16,89±0,91 a
	18	16,60±0,07 a	14,57±0,12 c	13,97±0,05 d	7,43±0,02 h	12,38±0,08 e	8,89±0,10 f	8,01±0,03 ag	9,15±0,09 f	7,71±0,08 gh	15,95±0,09 b	16,58±0,05 a
Frutose (g L <sup>-1</sup> )	24	16,98±0,49 a	14,21±0,20 bc	13,80±0,16 cd	7,78±0,05 f	10,35±0,07 e	12,32±0,02 d	9,06±0,02 ef	10,35±0,07 e	8,63±0,05 f	16,74±0,24 a	15,57±0,16 ab
	0	6,89±0,25 g	7,81±0,16 b	7,83±0,08 b	6,89±0,02 g	6,27±0,05 h	7,25±0,23 f	7,52±0,23 d	7,98±0,09 a	7,45±0,23 e	7,85±0,08 b	7,62±0,08 c
	6	8,64±0,02 a	8,22±0,16 ab	8,16±0,06 ab	3,84±0,06 dg	2,31±0,04 h	3,50±0,06 e	4,21±0,05 dg	3,73±0,02 de	4,00±0,15 d	7,79±0,01 bc	7,60±0,02 c
	12	10,02±0,22 a	9,57±0,08 ab	9,81±0,07 a	5,03±0,07 <sup>c</sup>	2,88±0,08 de	3,19±0,04 d	5,02±0,03 c	2,01±0,01 e	5,21±0,04 c	8,85±0,08 b	10,38±0,03 a
Produção de CO <sub>2</sub> (%)	18	9,73±0,16 a	9,35±0,07 a	9,51±0,04 a	5,59±0,09 <sup>c</sup>	4,64±0,07 d	2,21±0,04 f	3,58±0,07 e	1,49±0,01 g	5,86±0,07 c	8,38±0,09 b	9,76±0,08 a
	24	9,56±0,55 <sup>a</sup>	9,38±0,14 <sup>a</sup>	9,24±0,04 <sup>a</sup>	6,53±0,04 <sup>b</sup>	6,15±0,04 <sup>b</sup>	1,79±0,03 <sup>c</sup>	2,65±0,07 <sup>c</sup>	0,98±0,02 <sup>c</sup>	6,44±0,10 <sup>b</sup>	8,49±0,51 <sup>a</sup>	9,78±0,12 <sup>a</sup>
	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	6	0,00	25,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	9	31,03	41,50	31,25	0,00	33,33	0,00	17,86	0,00	0,00	0,00	0,00
	12	72,41	81,25	46,87	0,00	66,66	0,00	32,14	0,00	0,00	10,00	0,00
	15	65,51	40,62	62,50	3,22	100,00	6,25	50,00	0,00	12,00	10,00	0,00
24	18	51,72	31,25	50,00	3,22	66,67	6,25	28,57	12,00	12,00	10,00	5,17
	24	31,03	18,75	50,00	3,22	33,33	6,25	7,14	66,67	66,67	10,00	5,17

a) TF = Tempo de fermentação; b) *Lactobacillus acidophilus*; c) *L. amilovoratus*; d) *L. brevis*; e) *L. bulgaricus*; f) *L. fermentum*; g) *L. jhonsonii*; h) *L. plantarum*; i) *L. reuteri*; j) *L. sakei*; k) *Pedococcus acidilactici*; l) *P. pentosaceus*; m) Acidez Titulável; n) Quociente de fermentação (razão molar entre o ácido láctico e acético). Letras diferentes indicam diferença significativa no Teste de Tukey (p<0,05) entre as BALs (linhas)

O ácido acético não foi encontrado apenas na massa fermentada pela *L. jhonsonii*. No entanto, nas massas fermentadas pelas demais BALs homofermentativas (*L. acidophilus*, *L. amilovor*, *L. bulgaricus*, *P. acidilactici* e *P. pentosaceus*) a concentração final de ácido acético variou de 1,50 a 21,56 mmol kg<sup>-1</sup>. A produção de ácido acético nestas massas, pode estar relacionada com a presença de outras bactérias da farinha, como as bactérias do ácido acético, como as *Acetobacter* sp. (SCHEIRLINCK *et al.*, 2008; RIPARI, GÄNZLE, *et al.*, 2016) e por espécies de leveduras que produzem ácido acético. Algumas espécies de leveduras como a *Candida krusei* e *Wichehamomyces anomalus* podem produzir de 1,0 até 2,0 g L<sup>-1</sup> ácido acético (SWIEGERS, 2005).

No *sourdough*, a razão molar entre a concentração de ácido láctico e acético é conhecida como Quociente de Fermentação (QF), o qual é afetado pelos carboidratos disponíveis na farinha, temperatura de fermentação, concentração de oxigênio e pela microbiota.

A massa fermentada pela *P. pentosaceus* apresentou o maior QF (82,36) (Tabela 1), o qual foi estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) das demais massas. Este resultado é devido à alta concentração de ácido láctico e a baixa concentração de ácido acético. Para a *L. jhonsonii* não foi possível calcular o QF devido à concentração de ácido acético ser menor que o mínimo detectado na análise (1,7 mmol kg<sup>-1</sup>). A *L. reuteri* apresentou o valor de QF de 2,48, a única dentro do recomendado por (HAMMES e GÄNZLE, 1998) 2,0-2,7. Este resultado reforça a necessidade de adição conjunta de BALs homofermentativas e heterofermentativas, garantido uma boa acidificação e aromatização do *sourdough* (DECOCK e CAPPELLE, 2005).

No *sourdough*, o total de ácidos orgânicos sintetizados durante o processo fermentativo é mensurado pela análise de ATT (CAPPELLE *et al.*, 2013). Em todas as massas estudadas o valor de ATT teve um grande aumento nas primeiras 12h de fermentação (Tabela 1). Neste mesmo período as BALs entraram na fase estacionária e as leveduras estavam na fase de declínio. Além disso, foi observada a redução acentuada do pH e o aumento na concentração dos valores de ácido acético e láctico.



Os valores de ATT em 12h estavam entre 11,49 a 28,75 mL NaOH 10g massa<sup>-1</sup> e atingiram valores de 20,93 a 27,45 mL NaOH 10g massa<sup>-1</sup> no final do processo, valores estatisticamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ). Esses valores são considerados altos quando comparados aos resultados de (VENTIMIGLIA *et al.*, 2015; CORONA *et al.*, 2016; ALFONZO *et al.*, 2017) que encontraram valores entre 2,1-14,70 mL NaOH 10g massa<sup>-1</sup>. A alta acidez da massa pode ter contribuído para o declínio da densidade celular das leveduras a partir de 12h de fermentação, visto que as leveduras toleram baixos pH mas não altas concentrações de ácidos orgânicos (SCHULZ, 1972).

As massas adicionadas da *L. acidophilus*, *L. brevis* e *L. fermentum* apresentaram os maiores resultados de ATT e concentrações de leveduras inferiores a log 2, (concentração mínima detectada) em 24h de fermentação (Tabela 1 and Figura 1). Já, nas demais massas a densidade celular de leveduras foi de 2,00 a 5,40 log UFC g<sup>-1</sup> ao final do processo fermentativo. A inibição ou favorecimento do crescimento das leveduras autóctones é fortemente influenciada pela temperatura, concentração de ácidos orgânicos formados e também devido a competição por carboidratos e nitrogênio durante a fermentação (DE VUYST *et al.*, 2009).

Na farinha de trigo integral, o amido é o carboidrato encontrado em maior quantidade seguido pela sacarose, maltose, glicose e frutose (BELITZ *et al.*, 2008). No início da fermentação, a concentração de maltose, glicose e frutose era de 15,38±0,33; 9,38±0,40 e 7,40±0,53 g L<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 1); esses valores são maiores que os reportados por (SAHLSTROM *et al.*, 2004; CODINĂ *et al.*, 2013) de aproximadamente 0,5 g L<sup>-1</sup>.

Durante o processo fermentativo a maltodextrina, glucose, maltose e sacarose são continuamente formadas devido a hidrólise do amido pelas enzimas amilolíticas ( $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e glucoamilases) presentes na farinha de trigo (BELITZ *et al.*, 2008; STRUYF *et al.*, 2016). Entretanto, parte dos açúcares liberados são consumidos pelas BALs e leveduras. Desta forma a concentração de carboidratos na massa é continuamente modificada (CODINĂ *et al.*, 2013). Para as massas adicionadas de *L. acidophilus*, *L. amilovor*, *L. brevis*, *P. acidilactici* e *P. pentosaceus*, a concentração de glucose e frutose aumentaram gradativamente até o final do processo, mostrando que a

concentração liberada destes açúcares por meio da hidrólise do amido era maior que a consumida pela microbiota.

As BALs heterofermentativas metabolizam a maltose via atividade da maltose fosforilase (DE VUYST e NEYSENS, 2005). Algumas BALs homofermentativas como a *L. jhonsonii* também podem fermentar a maltose, assim como algumas leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*, tornando este carboidrato fermentescível o mais importante no *sourdough* (FUJISAWA *et al.*, 1992; LITOPOULOU-TZANETAKI *et al.*, 1993).

As massas com menores concentrações de maltose ao final da fermentação foram as adicionadas de *L. reuteri* e *L. fermentum*. Estas BALs produzem a maltose fosforilase intracelularmente catalisando a clivagem fosforolítica da maltose, produzindo glicose-1-fosfato e glicose (GUINEE *et al.*, 1999). Apesar da baixa concentração de maltose e frutose (3,69 e 0,98 g L<sup>-1</sup>, respectivamente) em 24h, na massa com a *L. reuteri* não houve a inibição das leveduras (2 logs UFC g<sup>-1</sup>).

Durante a fermentação do *sourdough* as leveduras fermentam os carboidratos da farinha (sacarose, glicose, frutose e maltose) produzindo dióxido de carbono e etanol. A liberação de dióxido de carbono resulta na expansão da massa (crescimento) (GUERZONI *et al.*, 2013).

Todas os *sourdoughs* estudados apresentaram crescimento, mostrando a produção de CO<sub>2</sub>. As massas fermentadas pelas BALs homofermentativas apresentaram de 5,17 a 10,00% de crescimento em 24h, evidenciando que as leveduras autóctones da farinha apresentaram atividade fermentativa. Em 12h de fermentação, a massa adicionada da *L. bulgaricus* teve o maior crescimento entre as BALs homofermentativas, atingindo 80%. Neste período (12h), a densidade celular de leveduras dessa massa era a mais alta (4,02 logs UFC g<sup>-1</sup>) e a concentração de ácido acético era baixa (3,47mmol kg<sup>-1</sup>). Já em 24h de fermentação, ocorreu o decréscimo das leveduras e do volume que atingiram log 2 e 10%, respectivamente.

Dentre as massas avaliadas, a adicionada da *L. fermentum* apresentou o maior crescimento, atingindo 100% em 15h de fermentação. Entretanto, após este período a concentração de CO<sub>2</sub> reduziu drasticamente, atingindo 66% em 18h e 33% em 24h. Este mesmo comportamento foi identificado nas massas



com a *L. brevis*, *L. bulgaricus* e *L. reuteri*, o qual pode ter sido ocasionado devido a redução da densidade celular das leveduras a partir de 12h de fermentação ou pela solubilidade do glúten, devido ao aumento da acidez (CORSETTI, 2013).

O glúten é uma proteína complexa formada pela glutenina e gliadina. A glutenina é uma proteína solúvel em ácidos fracos e responsável pela força e elasticidade da massa. Já, a gliadina é solúvel em álcool e garante a viscosidade da massa (OSBORNE, 1907; GÄNZLE *et al.*, 2008). Durante a fermentação do sourdough são produzidos álcoois e ácidos, os quais favorecem uma hidrólise moderada do glúten (CORSETTI *et al.*, 1998). O meio ácido aumenta as forças intermoleculares do glúten, causando o desdobramento e exposição das partes hidrofóbicas da proteína, assim a cadeia de glúten é parcialmente hidrolisada, formando uma emulsão com maior extensibilidade e menor elasticidade (CLARKE *et al.*, 2004).

### 3.3.2 Compostos Voláteis

Além das alterações na estrutura da massa, diversos compostos voláteis são formados durante a fermentação do *sourdough* os quais são responsáveis pelo odor e sabor dos produtos finais. Os compostos voláteis formados são fortemente influenciados pela microbiota presente (RAVYTS e DE VUYST, 2011; RIPARI, CECCHI, *et al.*, 2016).

Na Tabela 2 é observado que ao final da fermentação, os álcoois e ácidos carboxílicos eram responsáveis por mais de 44% da área total de todos os compostos identificados. Os álcoois variaram de 6,54 a 46,07 % área em relação ao total, sendo o 1-Hexanol e o 2,3 Butanediol os principais compostos presentes.

A massa adicionada da *L. sakei* teve a menor área percentual de álcoois, este resultado é devido a alta concentração de ácido butanoico, composto encontrado apenas nesta massa. A presença do ácido butanoico não é desejada, visto que o mesmo remete ao aroma de manteiga rança. Para as demais massas, o ácido hexanoico, láctico e octanoico foram os responsáveis pela representatividade dos ácidos carboxílicos.

TABELA 2 - PERFIL VOLÁTIL DO SOURDOUGH DE TRIGO INTEGRAL TIPO II FERMENTADO POR ONZE BACTÉRIAS LÁCTICAS A 35 °C DURANTE 24H.

(continua)

Compostos (percentual da área total)	TR <sup>1</sup>	L. <sup>2</sup> acidophilus HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> amiloovor HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> brevis HE <sup>5</sup>	L. <sup>2</sup> bulgaricus HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> fermentum HE <sup>5</sup>	L. <sup>2</sup> jhonsonii HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> plantarum FHE <sup>6</sup>	L. <sup>2</sup> reuteri HE <sup>5</sup>	L. <sup>2</sup> sakei FHE <sup>6</sup>	P. <sup>3</sup> acidilacti HO <sup>4</sup>	P. <sup>3</sup> pediococcus HO <sup>4</sup>
<b>Álcoois</b>												
2,3 Butanediol	3,88	0,98	nd	nd	39,16	1,49	nd	nd	2,16	nd	nd	nd
1-Hexanol	6,18	19,77	11,78	9,34	2,64	8,80	4,90	14,27	16,50	1,94	10,93	9,35
2-etil-1-hexanol	9,26	nd	nd	nd	0,69	2,50	nd	1,47	nd	0,36	nd	nd
2-etil-4-metil 1-Pentanol	9,26	1,29	3,43	2,73	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,07	nd
1-heptanol	9,62	3,11	nd	nd	0,46	1,24	nd	2,43	nd	0,43	nd	1,17
1-octen-3-ol	9,83	nd	nd	nd	1,52	nd	nd	2,69	nd	nd	nd	nd
2-octen-1-ol (E)	11,85	6,74	nd	nd	0,57	3,20	1,57	1,15	11,99	1,71	nd	nd
1-Octanol	11,90	nd	1,58	0,63	0,48	nd	nd	1,62	nd	nd	1,53	nd
1-Decanol	11,92	nd	nd	0,95	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,82
Cicloheptanol	9,89	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	5,29	nd	nd	nd
Álcool fenilético	12,75	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,73	0,68	nd	nd
Ciclohexanemetanol alfa, alfa, 4-trimetil, trans	13,30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,21	0,30	nd	nd
Ciclohexanol, 3,5-dimetil	12,38	nd	nd	nd	nd	0,74	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1 Nonen-4-ol	12,36	nd	nd	nd	nd	nd	7,18	0,97	nd	0,60	nd	nd
Linalool	12,46	nd	nd	2,57	0,22	2,03	1,73	nd	1,32	nd	2,56	2,44
5-metil-2-1 (metiletil) ciclo- hexanol	13,81	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,48	nd
1-decin-4-ol	13,87	nd	nd	2,46	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1,2-Octanediol	15,05	nd	nd	1,20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4-Etilciclohexanol	15,71	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,41
1-benziloxi-3-metil -2-butanol	12,85	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,36	nd
Ciclohexanemetanol alfa, alfa, 4-trimetil, trans	13,30	nd	nd	nd	nd	nd	1,07	nd	nd	nd	0,79	1,31
2,4-Decadien-1-ol, (E, E) -	15,96	2,48	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,52	nd	nd
1,7-heptanodiol	16,70	nd	nd	nd	nd	1,16	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7-etoxi-3,7-dimetil (E)-2- octen-1-ol	18,11	nd	nd	3,91	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-heptil-2,5-diol, 6-metil-5- (1- metiletil)	17,51	nd	nd	2,27	nd	0,72	nd	nd	nd	nd	nd	nd
L-alfa-terpinol	14,11	nd	nd	1,02	nd	nd	nd	0,25	nd	nd	nd	nd

(continua)

	TR <sup>1</sup>	L. <sup>2</sup> <i>acidophilus</i> HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> <i>amilovor</i> HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> <i>brevi</i> HE <sup>5</sup>	L. <sup>2</sup> <i>bulgaricus</i> HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> <i>fermentum</i> HE <sup>5</sup>	L. <sup>2</sup> <i>ihonsonii</i> HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> <i>plantarum</i> FHE <sup>6</sup>	L. <sup>2</sup> <i>reuteri</i> HE <sup>5</sup>	L. <sup>2</sup> <i>sakei</i> FHE <sup>6</sup>	P. <sup>3</sup> <i>acidilacti</i> HO <sup>4</sup>	P. <sup>3</sup> <i>pediococcus</i> HO <sup>4</sup>
2,7 dimetil-4,5 Octanodiol	8,93	nd	nd	nd	nd	nd	1,10	nd	nd	nd	nd	nd
Alcool benzílico	11,16	nd	nd	nd	0,33	nd	0,64	nd	nd	nd	nd	nd
<b>Área Percentual</b>		<b>34,37</b>	<b>16,79</b>	<b>27,08</b>	<b>46,07</b>	<b>21,88</b>	<b>18,19</b>	<b>24,65</b>	<b>40,20</b>	<b>6,54</b>	<b>21,72</b>	<b>17,52</b>
<b>Aldeídos</b>												
4-Decenal, (E)	15,94	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	4,85	1,23	nd	nd
Hexanal	4,03	0,70	5,30	4,40	2,26	5,24	1,11	0,93	nd	nd	6,19	6,48
2-Heptenal (E)	9,22	nd	nd	nd	1,43	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-Heptenal (Z)	9,22	nd	nd	nd	nd	nd	1,73	1,23	nd	0,31	nd	4,20
Benzeneacetaldéido	11,35	1,87	5,58	2,41	0,89	3,85	2,66	0,81	1,04	0,24	3,81	7,09
2-Octenal, (E)-	11,63	2,53	8,92	nd	5,49	6,86	4,53	4,37	nd	1,29	8,16	9,62
Octanal	10,43	nd	nd	nd	0,31	0,99	nd	nd	nd	0,17	nd	nd
Nonanal	12,37	1,29	2,88	1,36	0,90	nd	1,04	1,76	nd	0,54	nd	nd
2,5-Di-hidroxibenzaldeído, derivado de 2TMS	12,56	0,75	1,29	0,94	0,68	1,02	1,43	nd	nd	0,28	nd	nd
Decanal	13,72	0,85	2,17	1,76	0,51	1,22	0,87	2,66	0,92	0,37	1,96	1,62
2-Nonenal, (E)-	12,73	nd	1,50	2,27	0,62	0,82	1,63	1,78	nd	0,48	2,04	1,68
2,4-Decadienal, (E,E)-	15,43	nd	nd	nd	6,78	nd	5,42	0,39	nd	nd	nd	nd
2,4 Nonadienal (E,E)	14,48	nd	nd	nd	0,33	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-Undecenal	15,32	nd	nd	nd	0,30	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Trans-4,5-Epoxi-(E)-decenal	16,89	nd	nd	nd	1,79	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<b>Área Percentual</b>		<b>7,99</b>	<b>27,64</b>	<b>13,14</b>	<b>22,29</b>	<b>20,00</b>	<b>21,99</b>	<b>13,93</b>	<b>6,81</b>	<b>4,91</b>	<b>22,16</b>	<b>30,69</b>
<b>Ácidos carboxílicos</b>												
Ácido butanoico (ácido butírico)	3,66	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	71,32	nd	nd
Ácido hexanoico	9,96	28,37	15,52	8,36	11,60	12,81	14,57	17,54	11,70	4,85	11,53	14,31
Ácido L-láctico	6,69	5,03	9,11	10,89	4,47	15,22	13,88	10,79	6,19	nd	11,66	5,11
Ácido pentanoico	6,84	2,29	nd	nd	0,40	0,76	nd	2,93	nd	0,24	nd	0,96
Ácido heptanoico	11,98	nd	nd	nd	0,40	nd	0,98	0,81	nd	0,07	nd	nd
Ácido octadecanoico	12,05	0,52	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ácido octanoico	13,57	8,09	nd	nd	4,53	7,37	5,88	6,66	9,68	3,91	7,21	6,29
Ácido fosfonoacético, derivado 3TMS	14,32	0,99	nd	nd	0,48	nd	nd	0,83	nd	nd	nd	nd
Ácido 2-nonenóico	15,79	nd	nd	3,20	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

(continua)

	TR <sup>1</sup>	L. <sup>2</sup> <i>acidophilus</i> HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> <i>amiloovor</i> HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> <i>brevis</i> HE <sup>5</sup>	L. <sup>2</sup> <i>bulgaricus</i> HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> <i>fermentum</i> HE <sup>5</sup>	L. <sup>2</sup> <i>jhonsonii</i> HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> <i>plantarum</i> FHE <sup>6</sup>	L. <sup>2</sup> <i>reuteri</i> HE <sup>5</sup>	L. <sup>2</sup> <i>sakei</i> FHE <sup>6</sup>	P. <sup>3</sup> <i>acidilacti</i> HO <sup>4</sup>	P. <sup>3</sup> <i>pedilococcus</i> HO <sup>4</sup>
2- amino-4- metil Ácido benzóico	7,66	nd	nd	nd	0,22	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Dietil-Ácido Acético	5,28	nd	nd	nd	nd	nd	1,99	nd	nd	nd	nd	nd
		<b>45,29</b>	<b>24,53</b>	<b>22,45</b>	<b>21,88</b>	<b>36,16</b>	<b>37,30</b>	<b>39,56</b>	<b>27,57</b>	<b>80,39</b>	<b>30,4</b>	<b>26,67</b>
<b>Ester</b>												
Éster etílico do ácido propanoico, 2-hidroxi	4,43	nd	1,31	nd	nd	nd	nd	nd	3,57	nd	1,61	nd
Éster metil-decílico do ácido propenóico,	11,64	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,90	nd	nd	nd
Éster ciclopentílico do ácido 4-etilbenzóico	7,67	nd	2,51	nd	nd	nd	0,93	1,02	nd	nd	nd	nd
Éster trifluoro-dodecilico do ácido acético	10,43	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,69	nd	nd	nd	1,09
Éster 3-hexenílico (E) do ácido butanóico	14,05	nd	nd	1,20	nd	nd	nd	nd	nd	0,48	nd	nd
Éster do ácido docosanoico,	15,60	nd	3,69	nd	nd	nd	nd	0,11	nd	0,82	nd	nd
Éster 2-metil, 3-hidroxi-2,2,4-trimetilpentílico do ácido propanóico,	16,83	nd	nd	1,10	0,60	nd	nd	nd	0,31	0,46	0,68	nd
Éster heptadecílico do ácido 3-metil-2-butenóico,	14,68	nd	nd	1,42	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Éster etílico do ácido hexadecanóico,	23,75	1,31	2,81	3,99	0,60	4,90	3,16	1,02	2,44	0,56	2,77	4,65
Éster etílico do ácido linoleico	23,77	1,25	3,21	3,34	1,06	5,37	3,86	1,66	3,41	0,94	4,16	5,30
Éster isooctilo do ácido dodecanóico	24,80	nd	0,92	0,99	nd	nd	0,65	0,57	nd	nd	nd	nd
Éster 3,4-dimetil-etílico do ácido 2-pentenóico	19,12	nd	nd	8,25	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Éster 2,2dimetil-6-oxo-metil do ácido heptanóico	17,81	nd	nd	0,98	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Éster etílico do ácido octanóico	14,17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,29	nd	nd	nd	nd

(continua)

	TR <sup>1</sup>	L. <sup>2</sup> <i>acidophilus</i> HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> <i>amilovorus</i> HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> <i>brevis</i> HE <sup>5</sup>	L. <sup>2</sup> <i>bulgaricus</i> HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> <i>fermentum</i> HE <sup>5</sup>	L. <sup>2</sup> <i>jhonsonii</i> HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> <i>plantarum</i> FHE <sup>6</sup>	L. <sup>2</sup> <i>reuteri</i> HE <sup>5</sup>	L. <sup>2</sup> <i>sakei</i> FHE <sup>6</sup>	P. <sup>3</sup> <i>acidilacti</i> HO <sup>4</sup>	P. <sup>3</sup> <i>pediococcus</i> HO <sup>4</sup>
Éster hexil undecílico do ácido sulfúroso,	15,19	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,75	nd	0,26	nd	nd
Éster do ácido 2-propenóico, 2-metil, decil	11,64	nd	nd	nd	1,06	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Éster 3-pentadecil do ácido Ciclobutanocarboxílico,	12,37	nd	nd	nd	nd	nd	0,64	nd	nd	nd	nd	nd
Éster do ácido ftálico, di (3,5-dimetilfenil)	21,69	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,10	nd
<b>Área Percentual</b>		<b>2,56</b>	<b>14,45</b>	<b>21,27</b>	<b>3,32</b>	<b>10,27</b>	<b>9,24</b>	<b>6,11</b>	<b>11,63</b>	<b>3,52</b>	<b>10,32</b>	<b>11,04</b>
<b>Alcanos</b>												
2,2,4,6,6 pentametil 3-Heptene	10,43	0,55	nd	nd	nd	nd	0,87	0,78	nd	nd	1,18	nd
2,6,6-trimetil-Heptene	10,44	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,75	nd	nd	nd	nd
3,6-dimetil-Octane	10,84	0,53	nd	nd	nd	nd	nd	0,70	nd	nd	nd	nd
2,2,4-trimetil-Hexane	10,85	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,46
3-etil-2-metil-1,3-Hexadiene	11,06	2,57	4,93	3,90	2,16	4,41	2,53	1,66	3,10	0,57	5,97	5,81
Dodecane	14,19	nd	nd	1,55	0,24	nd	0,81	0,46	0,58	0,13	nd	nd
3,6-dimetil-Undecane	14,41	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,41	nd	nd	nd	nd
3,5-dimetil-Octane	14,41	nd	0,90	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7-Oxabiciclo[2,2,1] heptane, 1-metil-4-(1metiletil)	14,45	nd	nd	0,82	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2,4-dimetil-Eicosane	15,18	nd	1,90	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,76	nd	nd
2,2,6-trimetil -Octane	9,25	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,85	nd	nd	nd	nd
2,2,3,5—tetrametil-Heptane	9,27	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,48	1,48	nd	nd	nd
1-iodo-Octadecane	15,34	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,04	nd	nd
5-(1-metilpropil)-Nonane	15,42	nd	1,36	nd	nd	nd	nd	nd	1,13	0,32	nd	nd
2,6,10-trimetil-Dodecane	15,42	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,37	0,58	0,15	0,58	nd
4,6-dimetil-Dodecane	15,44	0,82	nd	nd	nd	nd	nd	1,47	nd	0,07	nd	nd
5-(2-metilpropil)-Nonane	15,55	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1,13	0,32	nd	nd
Tetradecane	17,10	1,10	nd	1,13	nd	nd	1,53	0,78	nd	nd	1,94	1,57
8-metil-Heptadecane	17,10	nd	nd	nd	0,75	1,44	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Hexadecane	19,58	0,29	1,80	nd	nd	nd	nd	0,41	nd	0,23	nd	nd
1,3,5,7 ciclooctatetrane	7,13	nd	nd	nd	0,29	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

	TR <sup>1</sup>	L. <sup>2</sup> <i>acidophilus</i> HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> <i>amilovor</i> HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> <i>brevis</i> HE <sup>5</sup>	L. <sup>2</sup> <i>bulgaricus</i> HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> <i>fermentum</i> HE <sup>5</sup>	L. <sup>2</sup> <i>jhonsonii</i> HO <sup>4</sup>	L. <sup>2</sup> <i>plantarum</i> FHE <sup>6</sup>	L. <sup>2</sup> <i>reuteri</i> HE <sup>5</sup>	L. <sup>2</sup> <i>sakei</i> FHE <sup>6</sup>	P. <sup>3</sup> <i>acidilacti</i> HO <sup>4</sup>	P. <sup>3</sup> <i>pediococcus</i> HO <sup>4</sup>
2,2,3 trimetil - Octane	9,25	nd	nd	nd	0,20	nd	1,69	nd	nd	nd	nd	nd
1,3 dimetil-cis, Cíclohexane	15,33	nd	nd	nd	0,18	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Área Percentual		5,86	10,89	7,40	3,53	5,85	7,43	10,12	8,00	2,59	9,67	7,84
Cetonas												
6-metil, 5-Hepten-2-one	0,050	nd	0,98	nd	nd	0,89	1,34	1,45	1,30	0,59	nd	1,04
2,6,9-Undecatrione	5,217	nd	nd	2,89	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
di-hidro-5-pentil-2(3H)-Furanone,	5,687	1,91	2,40	2,89	1,80	3,05	2,59	1,88	3,17	1,11	2,37	2,89
Área Percentual		1,91	3,38	5,78	1,80	3,94	3,93	3,33	4,47	1,70	2,37	3,93
Outros												
2-pentil-Furan	0,126	2,02	2,22	2,88	1,11	1,90	1,51	2,30	1,32	0,35	3,36	2,33
Área Percentual		2,02	2,22	2,88	1,11	1,90	1,92	2,3	1,32	0,35	3,36	2,33

<sup>1</sup>TR= Tempo de Retenção em minutos; <sup>2</sup>L. = *Lactobacillus*; <sup>3</sup>P. = *Pediococcus*; <sup>4</sup>HO = Homofermentativa; <sup>5</sup>HE = Heterofermentativa; <sup>6</sup>FHE = Heterofermentativa Facultativa; nd = não detectado

<sup>1</sup>TR= Tempo de Retenção em minutos; <sup>2</sup>L. = *Lactobacillus*; <sup>3</sup>P. = *Pediococcus*; <sup>4</sup>HO = Homofermentativa; <sup>5</sup>HE = Heterofermentativa; <sup>6</sup>FHE = Heterofermentativa Facultativa; nd = não detectado

Além dos álcoois e ácidos carboxílicos, os compostos do grupamento ésteres são de extrema importância para o aroma do *sourdough*, pois conferem aroma de frutas e flores.

O éster etílico do ácido hexadecanoico e o éster etílico do ácido linoleico foram os ésteres presentes em todas as massas a partir de 12h de fermentação. A massa fermentada com *L. brevis* apresentou maior área de ésteres, (21,27%) sendo o éster do ácido 3,4-dimetil-etílico 2-pentenóico o composto representante (aroma frutado). A *L. brevis*, apresenta uma boa adaptação ao meio do *sourdough*, sendo uma das bactérias mais encontradas em massas fermentadas naturalmente (CORSETTI *et al.*, 2001; SIEPMANN *et al.*, 2018). As massas com menores % áreas de ésteres foram as adicionadas da *L. acidophilus* (2,56%), *L. bulgaricus* (3,32%) e *L. sakei* (3,52%). Estes resultados devem-se aos altos valores de áreas encontradas para os ácidos carboxílicos e/ou álcoois.

A *L. fermentum* e a *P. acidilactici* apesar de possuírem mais de 10% de área em ésteres apresentaram uma alta área de ácidos carboxílicos (36,16 e 30,40%, respectivamente), gerando uma acidez excessiva no produto. A alta acidez pode ter auxiliado na redução da densidade celular de leveduras presentes nestas massas. Já as massas com menor teor de ésteres % foram aquelas com *L. acidophilus* (2,56%), *L. bulgaricus* (3,32%) e *L. sakei* (3,52%). Estes resultados são devidos aos altos valores de área determinados para os ácidos carboxílicos e álcoois nestas massas.

### 3.4 CONCLUSÕES

Das 11 bactérias lácticas testadas, a *L. reuteri* teve o melhor desempenho na fermentação do *sourdough*, alcançando o valor ideal de QF, sem inibir o crescimento das leveduras e apresentando um ideal perfil aromático. A *L. amilovor*, *L. brevis* e *P. pentosaceus* produziram massas com boas características aromáticas, produção adequada de ésteres, baixa concentração de álcoois e ácidos carboxílicos e sem a formação de compostos indesejáveis. No entanto, essas massas não apresentaram as qualidades tecnológicas ideais (como acidez e expansão da massa), devendo ser utilizadas em co-cultura com outras BALs. Desta forma, o próximo passo deste

trabalho será avaliar a fermentação do *sourdough* tipo II usando estas bactérias selecionadas em co-cultivo.



ARTIGO IV

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DE DIFERENTES  
CULTURAS INICIADORAS NAS CARACTERÍSTICAS  
BIOQUÍMICAS E NA EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS  
AROMÁTICOS DO *SOURDOUGH* TIPO II E DOS PÃES**

Este artigo foi publicado na revista LWT- Food Science and Technology –

Anexo C

## Resumo

A adição de diferentes combinações das Bactérias ácido lácticas (BAL): *Lactobacillus amilovorus*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. reuteri* e *Pediococcus pentosaceus* em *sourdoughs* tipo II fermentados a 28 e 35 °C durante 24h foi estudada. Os *sourdoughs* foram avaliados quanto a acidez, produção de CO<sub>2</sub>, crescimento das BALs e leveduras, consumo de carboidratos e produção de compostos voláteis (PCV). Após, foram selecionadas quatro culturas starters para a adição em pães de trigo, os quais foram comparados com o controle (sem *sourdough*) em relação a dureza, a evolução do pH e da PCV. A Análise de Componentes Principais, identificou que 44,10% das diferenças entre os *sourdoughs* resultaram da alteração na temperatura. A 28 °C observou-se um aumento médio de 50% na densidade celular de leveduras e no consumo de glicose, de 257% na produção de CO<sub>2</sub>, e 50% menos acidez. O perfil aromático do *sourdough* foi influenciado tanto pela cultura iniciadora quanto pela temperatura, sendo a 35°C identificado mais aldeídos e menos álcoois. Nos pães, a adição do *sourdough* aumentou em 38% a concentração de compostos voláteis com aromas de flores e frutas em relação ao controle. Também foi observado o aumento da firmeza do miolo, a qual teve forte correlação negativa com o pH ( $r=0,81$ ). Contudo, com a adição da *L. brevis* e *L. plantarum* a 35 °C, o pão apresentou boa acidez, a dureza foi estatisticamente semelhante ao controle, e o perfil aromático foi melhorado pela predominância de compostos com aromas frutados.

## 4 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DAS CULTURAS INICIADORAS NAS CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E NA EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS NO *SOURDOUGH* TIPO II E NOS PÃES DE TRIGO

### 4.1 INTRODUÇÃO

O *sourdough* é uma massa fermentada por bactérias do ácido láctico (BALs) e leveduras, o qual é utilizado como agente fermentativo em produtos de panificação (HAMMES e GÄNZLE, 1998). Esta massa pode ser classificada em quatro tipos, conforme o método de produção utilizado. O *sourdough* tipo I é fermentado por longos dias sendo a microbiota da farinha, água e do ambiente responsáveis pela fermentação (BÖCKER *et al.*, 1995; NIONELLI *et al.*, 2014). No *sourdough* tipo II, as BALs em conjunto ou não com as leveduras são adicionadas como culturas iniciadoras, as quais fermentam a massa por 15-24h; e pela desidratação desta massa é produzido o *sourdough* tipo III (DE VUYST *et al.*, 2014). Já, o tipo IV é uma mistura entre o *sourdough* tipo I e II, em que são adicionadas as culturas iniciadoras ou outros inóculos, como frutas e mel, e fermentado por longos dias (SIEPMANN *et al.*, 2018).

Diversos estudos tem avaliado os benefícios da adição dos *sourdoughs* tipo I e IV, como o aumento na vida de prateleira, devido a alta acidez, produção de antifúngicos (MANINI *et al.*, 2016; DEMIRBAŞ *et al.*, 2017), bacteriocinas e antibióticos (LIU, X. *et al.*, 2018), exopolissacarídeos (LIU, A. *et al.*, 2018). Além da maior produção de compostos voláteis, como álcoois, aldeídos, ácidos carboxílicos que influenciam diretamente no sabor e no aroma contribuindo para a aceitação sensorial do produto final (QUÍLEZ *et al.*, 2006; MAKHOUL *et al.*, 2015; RIPARI, CECCHI, *et al.*, 2016).

Entretanto, o tempo necessário para a fermentação destes *sourdoughs* torna o processo oneroso além de dificultar a padronização das características finais dos produtos de panificação. Para isso, a utilização do *sourdough* tipo II é uma alternativa promissora, sendo possível utilizar uma cultura iniciadora adaptada (REALE *et al.*, 2019), controlar os parâmetros fermentativos melhorando o metabolismo microbiano e assim obter um *sourdough* com as características tecnológicas desejadas (MASTILOVIC *et al.*, 2001). Entretanto, a seleção de BALs homofermentativas e heterofermentativas que atuem em

sinergismo e com boa adaptação ao meio é uma etapa crucial (DECOCK e CAPPELLE, 2005), como observado pela *L. brevis*, *L. plantarum* e *P. pentosaceus* (DE VUYST *et al.*, 2014).

Neste caminho, este trabalho teve como objetivo produzir nove diferentes *sourdoughs* de trigo integral tipo II fermentados por diferentes combinações de co-cultivo de *L. amilovorus*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. reuteri* e *P. pentosaceus* a 28 e 35 °C. Os *sourdoughs* foram avaliados ao final de 24h de fermentação quanto ao crescimento das BALs e leveduras, produção de compostos voláteis e as características tecnológicas. Em seguida, foram selecionadas culturas *starters* para aplicação na produção do pão, o qual foram avaliados e comparados com o controle (adição apenas de fermento comercial) quanto a evolução do pH e da produção de compostos voláteis e, também a firmeza do produto final.

## 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.2.1 Micro-organismos

As BALs *L. amilovorus* (NRRL B-4540), *L. brevis* (NRRL B-4527), *L. reuteri* (NRRL B-14171) foram doadas pelo *ARS Culture Collection* (NRRL - EUA) e a *L. plantarum* and *P. pentosaceus* foram isoladas de farinha de trigo integral brasileira. As BALs foram cultivadas por 48 horas a 35 ° C em caldo Man-Rogosa-Sharpe modificado (MRSm) (10g peptona, 8g extrato de carne, 4g extrato de levedura, 10g glicose, 10g maltose, 1g tween 80, 2g fosfato dibásico, 5g acetato de sódio, 2g citrato de amônio, 0,2 g de sulfato de magnésio, 0,05 g de sulfato de manganês).

As cinco BALs foram combinadas em co-cultura, mantendo fixa a bactéria heterofermentativa facultativas *L. plantarum* e adicionadas como culturas iniciadoras na produção dos *sourdoughs* (Tabela 1).

TABELA 1 - CULTURAS INICIADORAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE  *SOURDOUGH* DE TRIGO INTEGRAL TIPO II FERMENTADOS DURANTE 24h A 28 E 35 ° C

<i>Sourdough</i>	Cultura iniciadora
1	<i>Lactobacillus brevis</i> + <i>L. plantarum</i>
2	<i>L. brevis</i> + <i>L. plantarum</i> + <i>Pediococcus pentosaceus</i>
3	<i>L. brevis</i> + <i>L. plantarum</i> + <i>L. amilovor</i>
4	<i>L. brevis</i> + <i>L. plantarum</i> + <i>P. pentosaceus</i> + <i>L. amilovor</i>
5	<i>L. reuteri</i> + <i>L. plantarum</i>
6	<i>L. reuteri</i> + <i>L. plantarum</i> + <i>P. pentosaceus</i>
7	<i>L. reuteri</i> + <i>L. plantarum</i> + <i>L. amilovor</i>
8	<i>L. reuteri</i> + <i>L. plantarum</i> + <i>P. pentosaceus</i> + <i>L. amilovor</i>
9	<i>L. reuteri</i> + <i>L. brevis</i> + <i>L. plantarum</i> + <i>P. pentosaceus</i> + <i>L. amilovor</i>

#### 4.2.2 Produção do *sourdough*

As BALs foram centrifugadas a 5000 x g por 5 min, lavadas duas vezes em solução de *Ringer* (Oxoid) e ressuspensas na mesma solução. As culturas iniciadoras foram adicionadas a uma concentração final de  $2,50 \times 10^4$ -  $4,75 \times 10^5$  UFC g<sup>-1</sup> na massa.

Cada *sourdough* foi preparado com 500g de farinha de trigo integral ( $72,8 \pm 0,05$  carboidratos totais;  $12,7 \pm 0,14$  proteína;  $10,7 \pm 0,27$  umidade;  $2,1 \pm 0,03$  lipídios;  $1,5 \pm 0,18$  cinzas) e 500g de água destilada estéril (rendimento de massa- RM de 200 = peso da massa x 100 / peso da farinha) e fermentados a 28 ou 35 °C durante 24 h.

#### 4.2.3 Análises nos *sourdoughs*

As amostras foram coletadas às 0h e 24h de fermentação para análises em triplicata de pH, acidez titulável (ATT), contagem em placa de BALs e leveduras, produção de CO<sub>2</sub>, quantificação de ácidos orgânicos (ácido acético e láctico) e carboidratos (maltose, glicose, frutose e amido) e identificação de compostos voláteis. O quociente de fermentação (QF) foi determinado como a razão molar entre o ácido láctico e acético.

##### 4.2.3.1 Análises de pH e ATT

O valor de pH das massas foi determinado por um pHmetro (Modelo Luca-210, MS Tecnoyon, São Paulo, Brasil) diluindo-se dez gramas da amostra

em 90 mL de água destilada. Estas mesmas amostras foram utilizadas para determinação da acidez total titulável (ATT) expressa como a quantidade (mL) de NaOH 0,1 N necessária para atingir o valor de pH de 8,5 (NIONELLI *et al.*, 2014)

#### 4.2.3.2 Produção de CO<sub>2</sub>

A geração de CO<sub>2</sub> como resultado da fermentação e aumento da massa foi medida indiretamente pela metodologia citada (VERNON-CARTER *et al.*, 2017) com modificações registrando o volume de cada variação (30 g) em uma proveta graduada de 100 mL. Os resultados são apresentados como a variação percentual em relação ao volume inicial.

#### 4.2.3.3 Análises microbiológicas

Para as contagem microbiológicas em placas, diluiu-se 10g das massas sólidas em 90 mL de solução salina peptonada estéril (1% [p / v] de peptona e 0,9% [p / v] de NaCl) e homogeneizada em um *stomacher* (BagMixer® 400; Interscience, Saint Nom , França) por 2 min em velocidade máxima e submetidos às diluições decimais seriadas. Para contagem das BALs foi utilizado o meio MRS adicionado de antifúngico (ciclopiroxolamina 10 mg mL<sup>-1</sup>) e incubado em jarra de anaerobiose a 35 °C por 48h. Para a contagem total de levedura foi utilizado o meio *Dicloran Rose Bengal Chloramphenicol* (DRBC) com 1mg L<sup>-1</sup> de cloranfenicol (Himedia, Índia) incubado aerobicamente a 28 °C por 48-72h.

#### 4.2.3.4 Quantificação dos ácidos orgânicos (ácido láctico e acético) e dos carboidratos (maltose, glicose, frutose e amido)

Os ácidos orgânicos (ácido láctico e acético) e os açúcares solúveis (maltose, glicose e frutose) foram quantificados por Cromatografia Líquida de Ultra-Performance (UPLC; Waters, modelo Acquity, Brasil) com índice de refração (IR). Para detecção utilizou-se a coluna HPX-87H (300x7.8mm) com temperatura de 50 °C, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM com vazão de 0,6mL<sup>-1</sup> e volume de injeção de 10µL. A etapa de extração foi realizada adicionando 1g da amostra em 1,0

mL de água ultrapura e mantida em repouso por 30 min, em seguida foram centrifugadas por 20 min ( $3.493 \times g$ ), resfriadas em banho de gelo e filtradas através de filtro de nylon  $0,22 \mu\text{m}$  (Millipore). O quociente de fermentação (QF), um importante parâmetro tecnológico que afeta o perfil aromático do *sourdough* (CORSETTI e SETTANNI, 2007) foi determinado pela razão molar entre o ácido láctico e o ácido acético. A quantificação do amido foi realizada de acordo com Fuwa (1954).

#### 4.2.3.5 Identificação dos compostos voláteis

Os compostos voláteis foram identificados utilizando a técnica de microextração em fase sólida (SPME) com a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) (Shimadzu, modelo TQ8040, Japão). Para cada amostra, foram aquecidas 5g a  $60^\circ\text{C}$  por 30 min e expostas à fibra de SPME (Carboxen / Polydimethylsiloxane - CAR / PDMS) por 30 min. Em seguida a fibra foi inserida no Cromatógrafo para dessorção térmica dos compostos voláteis por 5 min. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo constante de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . A rampa de temperatura do forno foi regulada para  $60^\circ\text{C}$  por 5 min, em seguida, aumentada de  $60$  a  $260^\circ\text{C}$  a  $5^\circ\text{C min}^{-1}$  e mantida a  $260^\circ\text{C}$  por 5 min e, em seguida, a  $5^\circ\text{C min}^{-1}$  a temperatura foi aumentada até  $300^\circ\text{C}$ . Os espectros de massa foram adquiridos em modo de impacto de elétrons ( $70 \text{ eV}$ ), usando varredura completa com análise de massa na faixa  $m/z$  30–400. A temperatura da linha de transferência foi estabelecida a  $270^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.4 Produção dos pães

Para a produção de pães de trigo, foram selecionados quatro *sourdoughs*, três fermentados a  $28^\circ\text{C}$ , que obtiveram os valores de QF dentro da faixa recomendada (2,0-2,7) por HAMMES & GÄNZLE (1998), e um a  $35^\circ\text{C}$ , o qual apresentou o menor de QF e a maior % de área de ésteres (nesta temperatura). Além disso, foi produzido um *sourdough* de trigo integral controle com  $\text{RM} = 200$ , sem adição de cultura iniciadora e não fermentado. Os pães foram produzidos misturando 150g do *sourdough* com 300 ml de água, 500g de

farinha de trigo branca (carboidratos  $74,00 \pm 0,05\text{g}$ , proteína  $11,30 \pm 0,50\text{g}$ , fibra  $1,50 \pm 0,01\text{g}$ , umidade  $11,70 \pm 0,32\text{g}$ , lipídeo  $1,00 \pm 0,07\text{g}$ ), 3,5 g de levedura desidrata e 10,00 g de sal. As massas foram sovadas até o desenvolvimento completo, fermentadas durante 6 h a  $30^\circ\text{C}$  e assadas durante 40 min a  $250^\circ\text{C}$  com o forno pré-quecido durante 20 min. Em seguida, os pães foram resfriados à temperatura ambiente por 24h e armazenados em embalagens de polietileno até o momento das análises.

#### 4.2.5 Análise das qualidades dos pães

Antes e depois do cozimento, foram coletadas amostras para análise de pH e compostos voláteis, segundo metodologias dos tópicos 4.2.3.1 e 4.2.3.5, respectivamente.

Após o resfriamento, foi realizada a análise do perfil de textura (TPA) utilizando o texturômetro Brookfield CT3 equipado com o software Texture Pro CT V 1.8. Cada fatia de 25 mm espessura foi comprimida com um cilindro esférico de 38 mm, mantendo a velocidade do teste de  $1\text{ mm s}^{-1}$  e deformação da altura de 40%. As análises mensuradas foram firmeza e resiliência, sendo a primeira correspondente a força máxima exercida para antigir a deformação determinada, expressa em gram (g). A resiliência (elasticidade) é definida como a capacidade de recuperação de uma determinada deformação e foi calculada pela razão entre a área da compressão e a área da descompressão e expressa em %.

#### 4.2.6 Análise estatística

Para avaliar os efeitos estatísticos da adição de cada cultura iniciadora e da mudança de temperatura de fermentação foram realizadas as análises de variância (ANOVA), pós teste de Tukey e correlação no *Statistic 7.0* (Statsoft, OK, USA). A Análise de Componentes Principais (PCA) foi conduzida nos *sourdoughs* para destacar as diferenças entre as amostras. O valor médio de cada análise, variável dependente, foi auto-escalada antes da utilização. O PLS Toolbox (versão 6.2, Eigenvector, Natwick USA) e o software MATLAB (7.0) foram utilizados para classificação e calibração.



## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.3.1 Características Microbiológicas e Tecnológicas dos *Sourdoughs*

Os resultados da Tabela 2 mostram que as características microbiológicas e físico-químicas dos *sourdoughs* foram influenciadas pela cultura iniciadora e temperatura de fermentação utilizada, concordando com Decock e Cappelle (2005).

O amido é o carboidrato encontrado em maior concentração nas farinhas de trigo, seguido pela sacarose, maltose, glicose e frutose (BELITZ *et al.*, 2008). Antes da fermentação dos *sourdoughs* avaliados, a concentração média de amido, maltose, glicose e frutose era de  $393,70 \pm 6,14$ ;  $14,88 \pm 0,33$ ;  $8,38 \pm 0,40$  e  $6,40 \pm 0,53$  g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Durante o processo fermentativo, o amido é continuamente hidrolisado por enzimas amilolíticas ( $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e glucoamilases) presentes na farinha de trigo e produzidas por algumas BALs, como *L. amilovor*us e *L. plantarum*, e por leveduras, como *Aspergillus oryzae* (BELITZ *et al.*, 2008; STRUYF *et al.*, 2016). Devido a hidrólise do amido, a maltodextrina, glicose, maltose e sacarose são liberados para o meio, e ao mesmo tempo consumidos pelas BALs e leveduras, alterando continuamente a concentração destes açúcares disponíveis na massa (GÄNZLE e FOLLADOR, 2012; CODINÃ *et al.*, 2013).

Nas massas 1 e 5 fermentadas a 35 °C (Tabela 2), observou-se as menores concentrações de maltose e frutose. Esta temperatura é ideal para crescimento das BALs, além disso, tanto *L. brevis* como a *L. reuteri* utilizam a maltose como substrato e a frutose como aceptor de elétrons (KANDLER, 1983; GÄNZLE e FOLLADOR, 2012). Porém ao adicionar uma das BALs homofermentativas (*L. amilovor*us e/ou *P. pediococcus*), a concentração final de amido, maltose e frutose, aumentaram indicando a competição por substrato e menor atividade das BALs heterofermentativas.

TABELA 2 – RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DOS SOURDOUGHS DE TRIGO INTEGRAL TIPO II FERMENTADOS DURANTE 24 HORAS A 28 E 35 °C

		(continua)					
Análise	Bactéria ácido láctico (BAL)	Levedura		Maltose (g L <sup>-1</sup> )		Frutose (g L <sup>-1</sup> )	
Massa	28 °C	35 °C	28 °C	35 °C	28 °C	35 °C	35 °C
1	8,63±0,07 <sup>b</sup> B	9,46±0,02 <sup>a</sup> A	3,45±0,05 <sup>cd</sup> A	1,00±0,15 <sup>cd</sup> B	11,31±0,16 <sup>e</sup> A	6,19±0,09 <sup>f</sup> B	1,89±0,23 <sup>c</sup> B
2	9,46±0,03 <sup>a</sup> A	9,57±0,05 <sup>a</sup> A	4,20±0,04 <sup>bc</sup> A	2,18±0,21 <sup>cd</sup> B	12,16±0,02 <sup>cd</sup> B	13,58±0,01 <sup>aa</sup> A	9,36±0,04 <sup>b</sup> A
3	9,46±0,00 <sup>a</sup> A	9,57±0,05 <sup>a</sup> A	4,23±0,07 <sup>bc</sup> A	3,18±0,21 <sup>ab</sup> B	11,53±0,03 <sup>e</sup> B	12,32±0,01 <sup>c</sup> A	10,49±0,00 <sup>a</sup> A
4	9,36±0,21 <sup>a</sup> A	9,16±0,01 <sup>b</sup> A	5,54±0,09 <sup>ab</sup> A	2,48±0,21 <sup>bcd</sup> B	12,42±0,05 <sup>bc</sup> A	10,97±0,01 <sup>d</sup> B	8,71±0,07 <sup>b</sup> A
5	8,78±0,02 <sup>b</sup> B	9,11±0,01 <sup>bc</sup> A	5,74±0,04 <sup>a</sup> A	3,60±0,00 <sup>a</sup> B	11,98±0,16 <sup>d</sup> A	9,47±0,01 <sup>e</sup> B	0,39±0,04 <sup>d</sup> B
6	9,27±0,01 <sup>a</sup> A	9,13±0,03 <sup>b</sup> B	2,71±0,03 <sup>d</sup> A	2,30±0,34 <sup>bcd</sup> A	12,56±0,07 <sup>b</sup> A	12,79±0,01 <sup>b</sup> A	8,66±0,02 <sup>b</sup> A
7	8,50±0,19 <sup>c</sup> B	8,99±0,01 <sup>c</sup> A	3,40±0,12 <sup>cd</sup> A	2,54±0,08 <sup>ac</sup> A	13,22±0,01 <sup>a</sup> A	12,18±0,02 <sup>c</sup> B	10,06±0,00 <sup>a</sup> A
8	9,38±0,06 <sup>a</sup> A	9,08±0,02 <sup>bc</sup> B	2,15±0,08 <sup>d</sup> A	2,90±0,07 <sup>ad</sup> A	12,29±0,07 <sup>bd</sup> A	12,09±0,01 <sup>c</sup> A	9,04±0,00 <sup>b</sup> A
9	8,89±0,03 <sup>b</sup> B	9,20±0,00 <sup>b</sup> A	3,48±0,21 <sup>cd</sup> A	2,92±0,10 <sup>ad</sup> A	1,80±0,01 <sup>f</sup> B	12,96±0,02 <sup>b</sup> A	9,39±0,00 <sup>b</sup> A

		Amido (g L <sup>-1</sup> )				pH		Acidez Titulável	
Análise	Glicose (g L <sup>-1</sup> )	28 °C	35 °C	28 °C	35 °C	28 °C	35 °C	28 °C	35 °C
Massa	28 °C	35 °C	28 °C	35 °C	28 °C	35 °C	28 °C	35 °C	35 °C
1	5,30±0,02 <sup>g</sup> B	15,66±0,17 <sup>a</sup> A	279,41±35,50 <sup>ac</sup> A	245,12±3,25 <sup>bca</sup>	4,57±0,00 <sup>b</sup> A	3,73±0,02 <sup>a</sup> B	10,56±0,16 <sup>c</sup> B	17,02±1,21 <sup>a</sup> A	
2	5,97±0,02 <sup>ef</sup> B	9,29±0,00 <sup>g</sup> A	233,92±13,11 <sup>bcd</sup> A	246,97±11,45 <sup>ba</sup>	4,06±0,00 <sup>f</sup> A	3,71±0,00 <sup>a</sup> A	12,94±0,55 <sup>a</sup> B	17,37±0,61 <sup>a</sup> A	
3	6,24±0,04 <sup>d</sup> B	13,78±0,01 <sup>c</sup> A	308,42±27,42 <sup>a</sup> A	273,02±13,72 <sup>aca</sup>	4,06±0,00 <sup>f</sup> A	3,57±0,03 <sup>c</sup> B	11,44±0,16 <sup>b</sup> B	19,36±0,48 <sup>a</sup> A	
4	5,83±0,03 <sup>f</sup> B	12,08±0,01 <sup>e</sup> A	279,55±35,52 <sup>ac</sup> A	231,05±10,62 <sup>ca</sup>	4,19±0,01 <sup>e</sup> A	3,66±0,03 <sup>ab</sup> B	12,44±0,31 <sup>abb</sup>	16,67±0,95 <sup>bca</sup>	
5	6,02±0,04 <sup>e</sup> B	10,66±0,00 <sup>f</sup> A	220,08±14,91 <sup>cd</sup> A	168,10±10,16 <sup>dB</sup>	4,50±0,01 <sup>d</sup> A	3,72±0,02 <sup>a</sup> B	11,22±0,16 <sup>b</sup> B	16,54±0,75 <sup>bca</sup>	
6	6,73±0,08 <sup>c</sup> B	10,78±0,01 <sup>f</sup> A	274,97±35,44 <sup>ac</sup> A	273,0±23,05 <sup>aca</sup>	4,02±0,01 <sup>g</sup> A	3,73±0,02 <sup>a</sup> B	13,72±0,39 <sup>a</sup> B	17,64±0,36 <sup>a</sup> A	
7	7,70±0,03 <sup>b</sup> B	14,69±0,02 <sup>a</sup> A	201,2±11,21 <sup>d</sup> B	289,04±5,55 <sup>ab</sup> A	4,53±0,01 <sup>c</sup> A	3,62±0,01 <sup>bc</sup> B	11,44±0,16 <sup>b</sup> B	17,80±0,14 <sup>ab</sup> A	
8	7,96±0,02 <sup>a</sup> B	12,64±0,00 <sup>d</sup> A	291,90±39,42 <sup>ab</sup> A	277,53±2,12 <sup>ab</sup> A	4,07±0,01 <sup>f</sup> A	3,73±0,02 <sup>a</sup> B	13,00±0,78 <sup>a</sup> B	16,73±0,43 <sup>c</sup> A	
9	0,08±0,00 <sup>h</sup> B	12,01±0,01 <sup>e</sup> A	309,34±11,74 <sup>a</sup> A	293,90±11,14 <sup>a</sup> A	4,60±0,00 <sup>a</sup> A	3,73±0,02 <sup>ab</sup> B	9,22±0,16 <sup>c</sup> B	17,64±0,25 <sup>a</sup> A	

Análise		CO <sub>2</sub>		Ácido Láctico (mg g <sup>-1</sup> )		Ácido Acético (mg g <sup>-1</sup> )		Quociente de Fermentação		(conclusão)
		28 °C	35 °C	28 °C	35 °C	28 °C	35 °C	28 °C	35 °C	
Massa										
1	66,17±0,70 <sup>dA</sup>	6,65±0,21 <sup>fB</sup>	3,87±0,02 <sup>eB</sup>	11,01±0,03 <sup>eA</sup>	2,09±0,00 <sup>aA</sup>	1,24±0,02 <sup>bB</sup>	2,09±0,00 <sup>aA</sup>	2,09±0,03 <sup>efB</sup>	3,51±0,00 <sup>fA</sup>	
2	34,27±1,33 <sup>eA</sup>	12,55±0,34 <sup>dB</sup>	5,64±0,02 <sup>cB</sup>	13,84±0,00 <sup>bA</sup>	0,55±0,00 <sup>cA</sup>	0,42±0,01 <sup>fB</sup>	0,55±0,00 <sup>cA</sup>	9,03±0,19 <sup>aB</sup>	16,78±0,01 <sup>cdA</sup>	
3	74,42±0,81 <sup>bA</sup>	9,06±0,23 <sup>eB</sup>	2,87±0,03 <sup>gB</sup>	11,32±0,00 <sup>dA</sup>	0,45±0,01 <sup>dB</sup>	0,82±0,02 <sup>dA</sup>	0,45±0,01 <sup>dB</sup>	2,34±0,04 <sup>eB</sup>	16,92±0,97 <sup>cA</sup>	
4	50,91±0,17 <sup>cA</sup>	6,38±0,40 <sup>fB</sup>	5,16±0,01 <sup>dB</sup>	10,69±0,07 <sup>fA</sup>	0,32±0,00 <sup>efB</sup>	3,88±0,02 <sup>aA</sup>	0,32±0,00 <sup>efB</sup>	0,89±0,00 <sup>gB</sup>	21,99±0,21 <sup>aA</sup>	
5	22,33±1,28 <sup>fA</sup>	16,86±,27 <sup>bB</sup>	3,71±0,01 <sup>fB</sup>	18,27±0,02 <sup>aA</sup>	0,95±0,01 <sup>bA</sup>	0,88±0,00 <sup>cB</sup>	0,95±0,01 <sup>bA</sup>	2,80±0,02 <sup>dB</sup>	12,74±0,01 <sup>eA</sup>	
6	24,91±0,12 <sup>fA</sup>	9,86±0,27 <sup>eB</sup>	6,05±0,01 <sup>bB</sup>	11,58±0,00 <sup>cA</sup>	0,55±0,00 <sup>cA</sup>	0,47±0,00 <sup>fB</sup>	0,55±0,00 <sup>cA</sup>	8,56±0,04 <sup>bB</sup>	14,00±0,30 <sup>deA</sup>	
7	37,65±1,40 <sup>eA</sup>	14,77±0,32 <sup>cB</sup>	2,67±0,02 <sup>hB</sup>	10,38±0,01 <sup>gA</sup>	0,37±0,01 <sup>eB</sup>	0,88±0,01 <sup>cA</sup>	0,37±0,01 <sup>eB</sup>	2,03±0,01 <sup>fB</sup>	18,56±1,26 <sup>bcA</sup>	
8	45,39±0,12 <sup>dA</sup>	13,85±0,31 <sup>cB</sup>	5,46±0,02 <sup>dB</sup>	10,55±0,00 <sup>gA</sup>	0,30±0,01 <sup>fB</sup>	0,53±0,02 <sup>eA</sup>	0,30±0,01 <sup>fB</sup>	6,86±0,20 <sup>cB</sup>	23,49±1,43 <sup>aA</sup>	
9	91,20±0,42 <sup>aA</sup>	27,82±0,25 <sup>aB</sup>	10,37±0,03 <sup>aB</sup>	11,56±0,01 <sup>cA</sup>	0,36±0,00 <sup>eB</sup>	0,82±0,01 <sup>dA</sup>	0,36±0,00 <sup>eB</sup>	8,49±0,07 <sup>bB</sup>	21,23±0,04 <sup>abA</sup>	

\*\* Letras minúsculas diferentes na mesma coluna (dentro de cada análise ) indicam diferença significativa a p≤0.05 entre as massas; \*\*\* Letras maiúsculas diferentes na mesma linha (dentro de cada análise) indicam diferença significativa p≤0.05 entre 28 e 35°C; (1): *Lactobacillus brevis* e *L. plantarum*; (2): *L. brevis*, *L. plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*; (3): *L. brevis*, *L. plantarum* e *L. amilovor*; (4): *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. amilovor* e *P. pentosaceus*; (5): *L. reuteri* e *L. plantarum*; (6): *L. reuteri*, *L. plantarum* e *P. pentosaceus*; (7): *L. reuteri*, *L. plantarum* e *L. amilovor*; (8): *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. amilovor* e *P. pentosaceus*; (9): *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. amilovor* e *P. pentosaceus*

Por isso, para a correta seleção de uma cultura iniciadora, o atributo de formação de compostos voláteis no *sourdough* deve ser avaliado em conjunto com os demais parâmetros, como QF, contagem de BALs e leveduras, pH e ATT. Desta forma, a Análise de Componentes Principais (PCA) é uma ferramenta estatística importante para avaliação das principais diferenças entre as massas.

Ao reduzir a temperatura de fermentação para 28 °C a densidade celular de leveduras de todas as massas (exceção da massa 8), e a produção de CO<sub>2</sub> aumentaram. Em adição, nesta temperatura todas as massas apresentaram concentrações finais de glicose 50% inferiores do que as fermentadas a 35 °C. Estes resultados indicam que as leveduras que cresceram nos *sourdoughs* a 28 °C utilizavam a glicose como substrato principal.

Comparando a concentração final de carboidratos (amido + glicose + frutose+ maltose) entre as massas 7 e 3 a 28 °C, as quais diferem apenas na BAL heterofermentativa adicionada, observou-se na primeira massa menor concentração de amido e maior de maltose e frutose. A *L. reuteri*, presente na massa 7, é capaz de hidrolisar intracelularmente as ligações glicosídicas  $\alpha$ 1-4 de polissacarídeos e as ligações glicosídicas  $\alpha$ 1-6 de amilopectina. Isto, deve-se ao gene *amylopullulanases* MalN, o qual não é encontrado na *L. brevis* (NAKAI *et al.*, 2009; GÄNZLE e FOLLADOR, 2012), justificando os resultados obtidos. Ainda na temperatura de 28 °C, observa-se que a massa 9 adicionada de todas as BALs apresentou a maior concentração final de amido, porém, tanto a maltose como a glicose estavam com valores próximo a zero. Como discutido anteriormente, as duas BALs heterofermentativas, hidrolisam a maltose e liberam glicose, a qual é utilizada como substrato tanto pelas BALs homofermentativas como pelas leveduras. Estes resultados indicam que a adição de todas as BALs levou a uma alta competição por substrato, o que pode limitar o crescimento de alguma BAL e/ ou levedura.

Devido ao metabolismo dos carboidratos pelas BALs e leveduras, são formados diferentes compostos, como ácido acético, láctico, etanol e CO<sub>2</sub> (AXELSSON, 1999), os quais por meio de rotas secundárias são transformados em aldeídos, cetonas e ésteres, responsáveis pelo aroma.

A razão molar entre o ácido láctico e acético, conhecido como Quociente de Fermentação (QF), é um importante parâmetro utilizado para avaliar o desempenho da fermentação do *sourdough*. Na Tabela 2, verifica-se que ao utilizar a maior temperatura de fermentação (35 °C), todas as massas tiveram altas concentrações

de ácido láctico (10,38 a 18,27 mg g<sup>-1</sup>) resultados similares aos obtidos por (LIU *et al.*, 2018), mas valores baixos de ácido acético (0,30 a 2,09 mg g<sup>-1</sup>). Consequentemente os valores de QF foram altos, variando de 3,51 (na massa 1) a 23,49 (massa 8), valores superiores a faixa de 2,0- 2,7 recomendado por (HAMMES e GÄNZLE, 1998). Entretanto, ao reduzir a temperatura para 28 °C, além da redução média de 57% de ácido láctico observou-se o aumento médio 67% de ácido acético (com exceção nas massas 1 e 5), semelhantes aos descritos por Decock e Capelle (2005). Desta forma, o valor de QF foi significativamente menor ( $p < 0.05$ ) a 28 °C, sendo que as massas 1 e 3 (adicionadas de 2 BALs) e a 5 e 7, (ambas com presença da *L. amilovor*), permaneceram dentro da faixa de QF ideal.

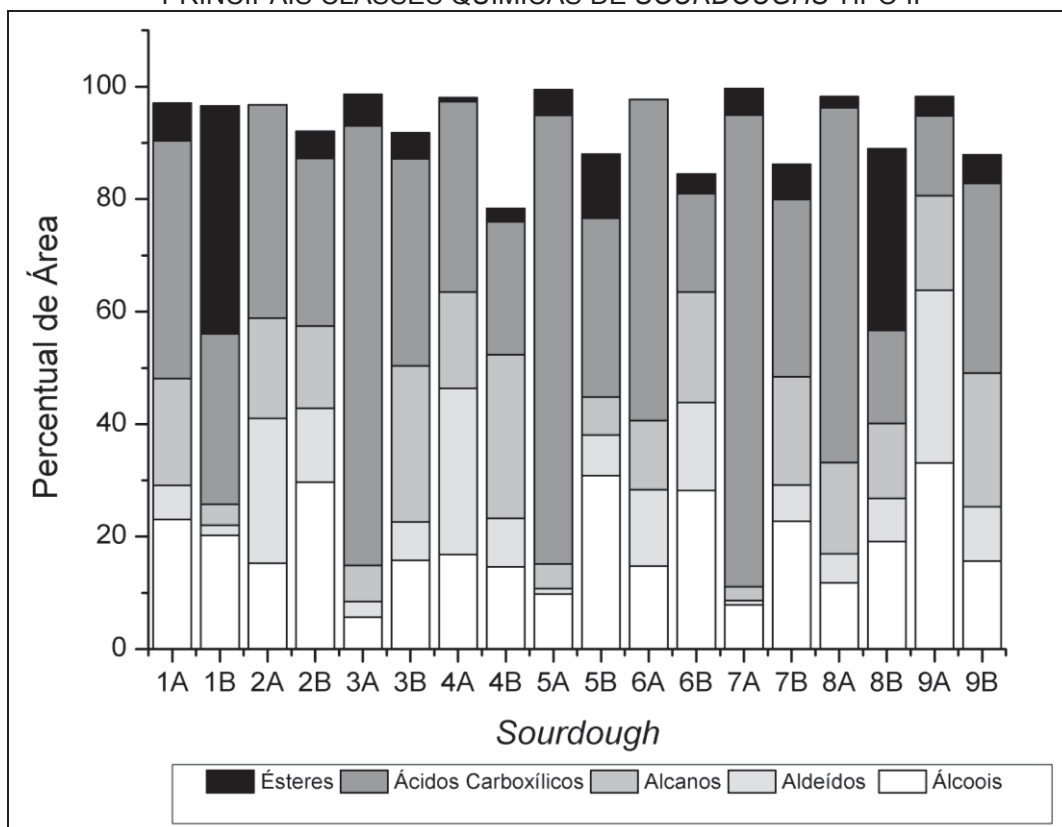
Além do ácido láctico e acético, outros ácidos orgânicos são produzidos durante a fermentação e que resultam no aumento da acidez da massa. No *sourdough* a acidez é avaliada por meio das análises de QF, ATT e pH. Na Tabela 2 verifica-se que a redução na temperatura de 35 para 28 °C influenciou no aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do pH de 3,69, para 4,29 e redução significativa ( $p < 0,05$ ) de ATT de 17,42 mLNaOH 10g<sup>-1</sup> para 11,78 mL NaOH 10g<sup>-1</sup>, valores médios.

A temperatura também influenciou os compostos voláteis produzidos durante a fermentação. Os resultados são apresentados na Figura 1 como a % de área de cada classe química em relação a área total dos picos encontrados em cada amostra.

Desta forma, verifica-se que na temperatura de 28 °C, os compostos voláteis das massas foram fortemente representados pela classe química dos ácidos carboxílicos e alcanos. Dentre os ácidos carboxílicos, o ácido butanoico (Apêndice B), estava presente em maior %, entretanto este composto é indesejado devido ao aroma de manteiga rança. Contudo na temperatura de 35 °C teve-se uma produção similar entre ácidos carboxílicos, álcoois, aldeídos e de ésteres (Figura 1). Em adição, também foi observada uma baixa % área do ácido butanoico, e a formação de diferentes ésteres que produzem aromas de flores e frutas, como o butanoico éster etílico (Apêndice B). Os ésteres podem ser formados pela esterificação dos ácidos carboxílicos, derivados de ácidos graxos (C6-C10) e álcoois (principalmente etanol) pela enzima acetiltransferases, e catalisado pela acetil coenzima A (BIRCH *et al.*, 2014). Entretanto, vale ressaltar que durante as etapas de fermentação e cozimento do pão ocorre a volatilização de alguns álcoois, ácidos e ésteres de baixo

massa molecular, além da formação de novos compostos aromáticos (BIRCH *et al.*, 2014).

FIGURA 1 – PERCENTUAL DE ÁREA DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS, AGRUPADOS NAS PRINCIPAIS CLASSES QUÍMICAS DE SOURDOUGHS TIPO II



Temperatura de Fermentação: (A)= 28 °C e (B)=35 °C. Micro-organismos: (1) *Lactobacillus brevis* e *L. plantarum*; (2) *L. brevis*, *L. plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*; (3) *L. brevis*, *L. plantarum* e *L. amilovor*; (4) *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. amilovor* e *P. pentosaceus*; (5) *L. reuteri* e *L. plantarum*; (6) *L. reuteri*, *L. plantarum* e *P. pentosaceus*; (7) *L. reuteri*, *L. plantarum* e *L. amilovor*; (8) *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. amilovor* e *P. pentosaceus*; (9) *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. amilovor* e *P. pentosaceus*

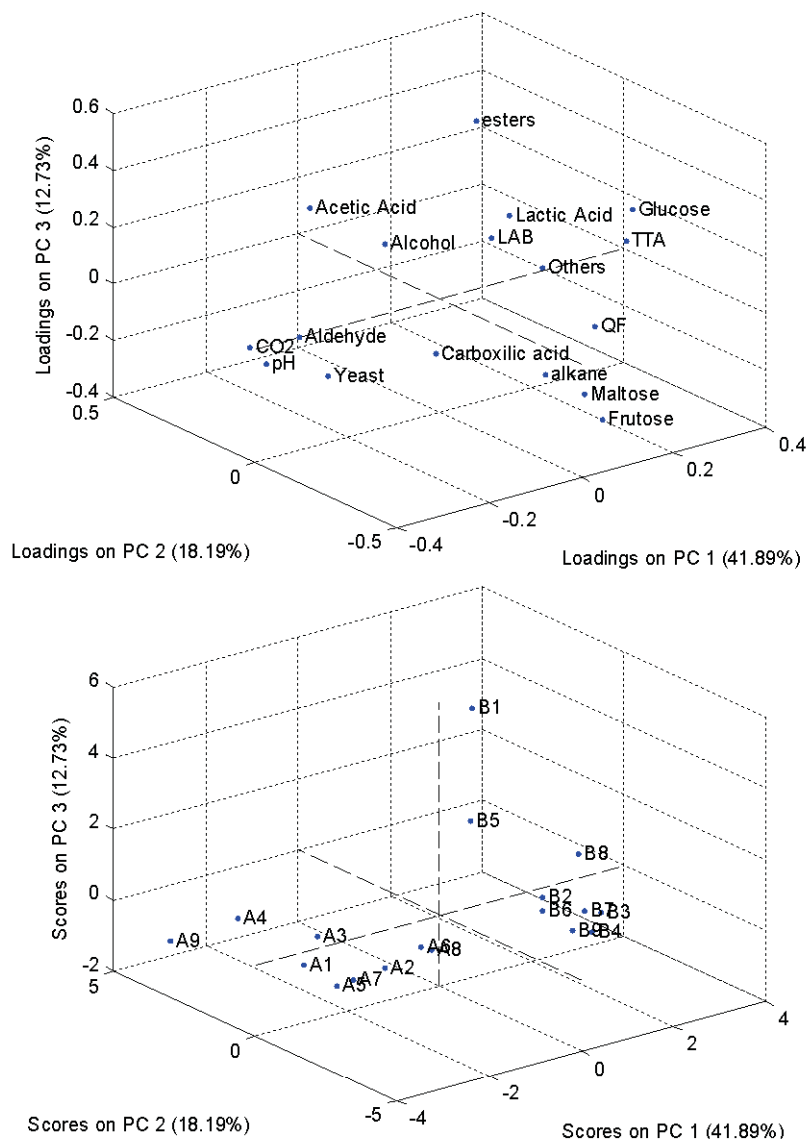
#### 4.3.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

Com os resultados das análises microbiológicas e tecnológicas foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA), os resultados encontram-se na Figura 2.

A análise de PCA explicou 76,64% das diferenças entre as massas utilizando três componentes principais (PCs). A PC1 separou as massas pela temperatura de fermentação, massas B (35 °C) no lado negativo e massas A (28 °C) no lado positivo. Este resultado juntamente com os *loadings* indica que 44,10% das variações entre as massas são explicados pela alteração da temperatura. Em

adição, ao avaliar o axial negativo PC1 e PC2 (Figura 2) são encontradas as amostras a 28 °C com maior % de área dos ácidos carboxílicos.

FIGURA 2: ANÁLISE DOS COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DOS PARÂMETROS TECNOLÓGICOS E DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DOS SOURDOUGHS TIPO II



Temperatura de fermentação: (A)= 28 °C; (B)= 35 °C; I) PCA score plot das três componentes principais (PC1, PC2 E PC3); II) Loadings para PC1, PC2 e PC3. Micro-organismos: (1) *Lactobacillus brevis* e *L. plantarum*; (2) *L. brevis*, *L. plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*; (3) *L. brevis*, *L. plantarum* e *L. amilovor*; (4) *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. amilovor* e *P. pentosaceus*; (5) *L. reuteri* e *L. plantarum*; (6) *L. reuteri*, *L. plantarum* e *P. pentosaceus*; (7) *L. reuteri*, *L. plantarum* e *L. amilovor*; (8) *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. amilovor* e *P. pentosaceus*; (9) *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. amilovor* e *P. Pentosaceus*

Em relação as amostras B (35 °C), as massas com maior % de aldeído e menor % de ácido carboxílico são identificadas no axial negativo da PC1 mas positivo da PC2. No axial positivo das duas PCs estão as massas com maiores % de



área de álcool e maior concentração de ácido láctico (B2, B5 e B6), já no axial positivo da PC1 e negativo da PC2 estão as com maiores concentrações de glicose.

A terceira PC (PC3) utilizou a maior % de área de ésteres, álcoois, aldeídos, além do maior valor de QF e de ácido acético para explicar as massas B1, B5, A9, B8 e A4, respectivamente.

A análise de PCA mostrou que as características físico-químicas e de compostos voláteis dos *sourdoughs*, avaliados na PC2 e PC3 foram influenciadas principalmente pela temperatura (PC1), confirmando os resultados discutidos no tópico 4.3.1.

Após avaliação de todos os resultados das características microbiológicas, físico-químicas e de voláteis, juntamente com o PCA foram selecionadas as culturas iniciadoras para a produção dos pães.

#### 4.3.3 Avaliação dos pães

As culturas selecionadas para a produção dos pães foram: 1A (*L. brevis* + *L. plantarum*), 3A (*L. brevis* + *L. plantarum* + *L. amilovorus*), e 7A (*L. reuteri* + *L. plantarum* + *L. amilovorus*), fermentados a 28 °C que apresentaram o valor de QF dentro do ideal. Além dessas, foi selecionada a massa 1B (*L. brevis* + *L. plantarum*) a 35 °C que obteve a maior % de área de ésteres e o menor valor de QF nesta temperatura.

Os resultados da evolução do pH e o perfil de textura dos pães são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 - ANÁLISE DO PERFIL DE TEXTURA E EVOLUÇÃO DO pH DE PÃO BRANCO COM E SEM ADIÇÃO DO *SOURDOUGH*.

Amostra*	pH <i>sourdough</i>	pH pão antes de assar	pH pão assado	Dureza (g) (pão assado)	Resiliência (pão assado)
Controle <sup>a</sup>	5,96±0,01 <sup>a</sup>	4,94±0,03 <sup>a</sup>	5,23±0,01 <sup>a</sup>	622,02±41,80 <sup>a</sup>	0,39±0,04 <sup>a</sup>
BP 35°C <sup>b</sup>	3,35±0,01 <sup>d</sup>	3,93±0,11 <sup>b</sup>	4,00±0,03 <sup>b</sup>	894,28±90,93 <sup>ab</sup>	0,41±0,00 <sup>a</sup>
BP <sup>c</sup>	3,67±0,01 <sup>b</sup>	3,70±0,01 <sup>c</sup>	3,86±0,08 <sup>bc</sup>	1299,90±104,01 <sup>cd</sup>	0,37±0,04 <sup>a</sup>
BPA <sup>d</sup>	3,43±0,00 <sup>c</sup>	3,79±0,01 <sup>bc</sup>	3,90±0,01 <sup>bc</sup>	1071,74±33,65 <sup>bc</sup>	0,37±0,01 <sup>a</sup>
RPA <sup>e</sup>	3,25±0,01 <sup>e</sup>	3,59±0,02 <sup>c</sup>	3,81±0,01 <sup>c</sup>	1382,71±101,7 <sup>d</sup>	0,36±0,02 <sup>a</sup>

\* Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa em  $p \leq 0,05$ ; <sup>a</sup> *Sourdough* não fermentado e sem a adição de cultura iniciadora; <sup>b</sup> BP = *L. brevis* + *L. plantarum* (*sourdough* fermentado a 35°C). Os outros *sourdough* foram fermentados a 28 °C. <sup>c</sup> = *L. brevis* + *L. plantarum* <sup>d</sup> = *L. brevis* + *L. plantarum* + *L. amilovorus*; <sup>e</sup> = *L. reuteri* + *L. plantarum* + *L. amilovorus*.

A avaliação do pH durante todas as etapas de produção dos pães mostra que apesar da alta acidez e das diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre todos os

*sourdoughs*, nos pães finais o pH teve um aumento, tornando as diferenças entre os pH menos discrepantes (3,81-4,00). Diferentemente, o pão controle apresentou pH inferior ao *sourdough* controle, resultado já esperado visto que não foi adicionada cultura iniciadora. Comparando os valores de pH antes e após o processo de assamento, em todos os pães ocorreu um leve aumento, podendo ser devido a volatilização de ácidos de pequena massa molecular.

Além do pH, a dureza do pão também foi influenciada pela adição do *sourdough* e pela temperatura de fermentação (Tabela 3). A menor dureza foi obtida no pão controle o qual foi estatisticamente semelhante ao pão produzido com o *sourdough* BP 35 °C. Este *sourdough* apresentava um baixo pH, entretanto ao ser adicionado na massa do pão, a acidificação tornou-se mais lenta, resultando num pão com menor acidez e menor firmeza.

Durante a etapa fermentação dos pães, as massas adicionadas com *sourdoughs* fermentados apresentaram aumento no volume, seguido de uma leve diminuição, resultando no aumento da dureza. Yu et al. (2018) observaram que os pães controle (sem *sourdough* – pH=5,33) apresentaram melhor capacidade de fermentação, porém, com menor retenção do CO<sub>2</sub> do que os pães com *sourdough* (pH= 4,56-4,87). Em nosso trabalho, os pH dos pães foram menores (controle 5,23 e com *sourdough* = 3,81-4,00) sendo identificada uma forte correlação negativa ( $r=0,81$ ) entre o pH e a firmeza dos pães assados. Desta forma, menores pH resultaram em maior firmeza

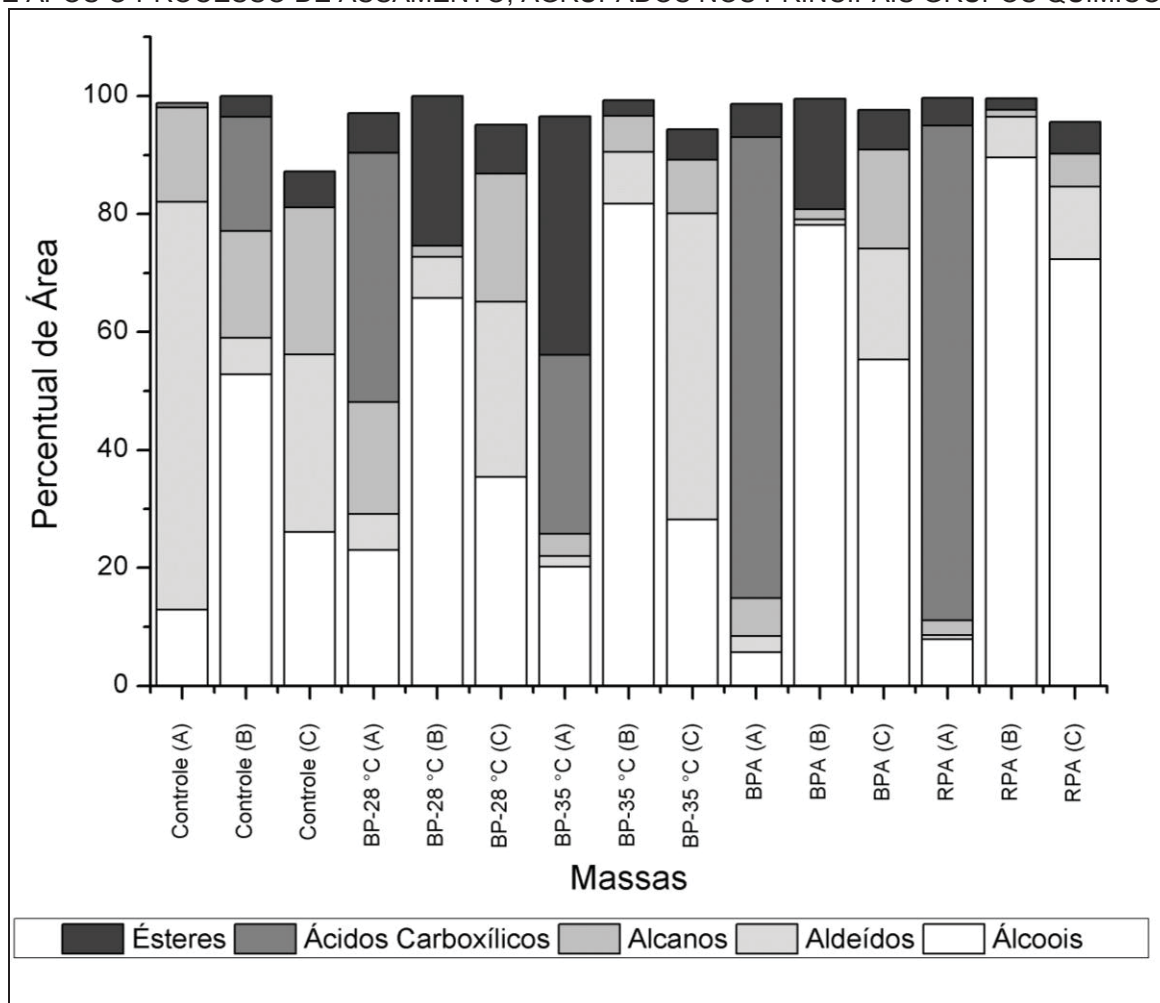
Este resultado pode ser explicado pela proteólise do glúten, causada pelo aumento da acidez, formando então uma massa com maior extensibilidade e menor elasticidade. Desta forma, estes resultados indicam que uma fermentação mais lenta ou menor tempo de fermentação são necessários.

Em contrapartida, devido a proteólise são liberados aminoácidos para o meio, os quais são essenciais para o crescimento das BALs e das leveduras, além de participar da reação de *Maillard* (GOBBETT *et al.*, 1995; CORSETTI *et al.*, 1998). Desta forma, a acidificação deve ser controlada de forma a garantir uma proteólise moderada. O pão fermentado com a *L. reuteri*, uma bactéria ácido-tolerante que acidifica a massa rapidamente sem ser supressada (HUYS *et al.*, 2013), apresentou a maior firmeza (1382,71 g). Estes resultados são semelhantes aos obtidos por (JEKLE e BECKER, 2012) que também observaram o aumento da firmeza devido a

adição de *sourdough*. Um dos caminhos para diminuir a acidez seria avaliar a redução no tempo de fermentação do *sourdough* e/ou do pão.

Na Figura 3, observa-se que durante a etapa de fermentação todas as massas de pães apresentaram redução na área percentual de ácidos (com exceção do controle) e aumento da área de álcoois, indicando a fermentação alcoólica pela *S. cerevisiae* adicionada

FIGURA 3 – COMPOSTOS VOLÁTEIS IDENTIFICADOS NOS SOURDOUGHS E NOS PÃES ANTES E APÓS O PROCESSO DE ASSAMENTO, AGRUPADOS NOS PRINCIPAIS GRUPOS QUÍMICOS



A) *sourdough* de trigo integral tipo II; B) pão branco antes de assar; C) pão branco após resfriamento. Controle: pão branco sem a adição de *sourdough* fermentado; BP-28 °C = *L. brevis* + *L. plantarum* (*sourdough* fermentado a 28 °C); BP-35 °C: *L. brevis* + *L. plantarum* (*sourdough* fermentado a 35 °C); BPA: *L. brevis* + *L. plantarum* + *L. amilovor* (*sourdough* fermentado a 28 °C); RPA: *L. reuteri* + *L. plantarum* + *L. amilovor* (*sourdough* fermentado a 28 °C).

Comparando a distribuição de compostos voláteis (Figura 3 e Tabela 1S), verifica-se que o pão controle teve uma distribuição homogênea entre alcanos, aldeídos e álcoois. Os compostos 1-Hexanol, com aroma de álcool e verde, e o seu

respectivo aldeído (Hexanal) com aroma verde e de gordura, foram os de maior representatividade no pão controle. Entretanto, a adição do *sourdough* influenciou principalmente no aumento do percentual da área dos álcoois, o qual foi representado pelo álcool fenílico, que possui aroma semelhante a rosa e mel. Este composto é formado na via formadora de sabor e aromas catalisada pelas leveduras (HANSEN e SCHIEBERLE, 2005) indicando que a adição de *sourdough* favoreceu a atuação da *S. cerevisiae* durante a fermentação do pão. Além disso, nos pães BP 35, BPA e RPA foi identificado o Furfural, composto atribuído a caramelização e conhecido pelo aroma de amêndoas (GROSCH, 1982). Este composto não foi encontrado no pão BP 28, indicando que tanto a cultura iniciadora como a temperatura de fermentação do *sourdough* exercem efeito no aroma do pão final.

O único composto aromático presente em maior % de área no pão controle foi o 2- pentilfurano, proveniente da oxidação enzimática ou da auto-oxidação dos lipídios presentes na farinha, e que possui aroma de frutas (GROSCH, 1982). Em relação aos ésteres, observa-se que todos os pães apresentaram % de área semelhantes, variando de 5,16 a 8,36. Ao somar a área dos principais compostos aromáticos (Álcool Fenílico; furfural, benzaldeído, dos ésteres e do 2-pentilfurano), os pães adicionados de *sourdough* apresentaram em média 38% de área a mais que o controle. O pão com maior área de compostos aromáticos foi o adicionado do *sourdough* RPA (80,29%), seguido do pão BP 35 °C (63,56%). Estes resultados indicam que a adição do *sourdough* aumenta a quantidade de compostos aromáticos no pão final, conferindo um aroma específico e único na migalha do pão, concordando com Pétel et al. (2017).

Os resultados deste trabalho mostram que o *sourdough* tipo II é uma alternativa viável para aumentar a qualidade tecnológica dos produtos de panificação sem a necessidade da fermentação lenta realizada pelo *sourdough* tipo I. Como complemento para este trabalho, nós remendamos o desenvolvimento de um perfil sensorial por análise sensorial com painel treinado, como a análise descritiva quantitativa (ADQ) e análise múltipla tempo-intensidade.

#### 4.4 CONCLUSÕES

As características tecnológicas e produção de compostos voláteis no *sourdough* são fortemente influenciadas pela cultura iniciadora adicionada e pela

temperatura de fermentação. Nos pães verificou-se uma forte correlação negativa entre o pH do pão e a dureza. O pão adicionado da *L. reuteri* apresentou o menor pH e a maior dureza, indicando a necessidade de reduzir o tempo de fermentação do *sourdough*. Em contrapartida o aroma deste pão foi caracterizado pela alta porcentagem de área de compostos aromáticos (80,29%). A adição da *L. brevis* e *L. plantarum* a 35 °C apresentou excelentes resultados, com a firmeza estatisticamente semelhante ao controle e com alta área de compostos aromáticas (63,56%). Portanto, este trabalho indica esta cultura iniciadora como ideal para aplicação na produção de pão de trigo.

**ARTIGO V****ESTUDO PRELIMINAR DA INFLUÊNCIA DO *SOURDOUGH* E DA  
REUTERICICLINA NA PREVENÇÃO DO *ROPE SPOILAGE* POR *Bacillus***

Este artigo é referente as análises realizadas durante os três meses de intercâmbio na  
Universidade de Alberta, sob a orientação do prof. Dr. Michael Gaenzle.

## Resumo

Neste trabalho foi investigada a influência da quantidade do *operon spoVA<sup>2mob</sup>* na resistência térmica de *Bacillus* ao processo de assamento e no desenvolvimento do *rope spoilage* em pão. O *rope spoilage* foi avaliado quanto ao aparecimento do aroma frutado e da degradação da textura. Além disso, foram avaliados os efeitos da adição de diferentes concentrações (3, 6, 12, 24%) do *sourdough* fermentado com a *Lactobacillus reuteri* e também a inoculação do *sourdough* com o *L. reuteri* produtora de reuteriicina na prevenção do *rope spoilage* em pães contaminados com a cepa de *Bacillus* mais resistente. Com os resultados verificou-se que o aumento da resistência térmica dos *Bacillus* e da degradação do pão foi proporcional a quantidade de *operon*. O incremento na concentração do *sourdough* reduziu a degradação no pão, sendo que com 24% não foi identificada nenhuma característica do *rope spoilage* durante os sete dias de avaliação. Com a adição de 12% de *sourdough* com a reuteriicina foi possível aumentar em mais dois dias o *shelf-life* do pão. Desta forma, é possível afirmar pela primeira vez na literatura que a reuteriicina auxilia na prevenção do *rope spoilage* em pães.



## 5 INFLUÊNCIA DO SOURDOUGH E DA REUTERICICLINA NA PREVENÇÃO DO ROPE SPOILAGE

### 5.1 INTRODUÇÃO

O *rope spoilage*, o crescimento de mofo, juntamente com o processo de endurecimento, são as principais causas de deterioração do pão, causando perdas nos produtos de panificação (VALERIO et al., 2008). No pão, o *rope spoilage* está principalmente associado à presença de esporos de espécies de *Bacillus*, sendo o *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amiloliquefaciens* e *B. pumilus*, os mais encontrados nas farinhas de trigo (KIRSCHNER e VON HOLY, 1989; KATINA et al., 2002; VALERIO et al., 2012). Como relatado em estudos, um baixo nível ( $\approx \log 10^2$ ) de esporos de *Bacillus* na farinha pode chegar a até  $\log 10^7$  UFC g<sup>-1</sup> no miolo de pão dentro de 12–24 h depois de assado (ROSENKVIST e HANSEN, 1995).

A resistência térmica dos esporos varia dentro da mesma espécie, devido à presença do *operon* spoVA<sup>2mob</sup> (BERENDSEN, BOEKHORST, et al., 2016). Este, foi previamente identificado no *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus* e *B. thermoamylovorans* (BERENDSEN, BOEKHORST, et al., 2016). Em estudos anteriores, identificou-se que o aumento do *operon* spoVA<sup>2mob</sup> pela clonagem assegurou maior resistência térmica aos esporos (BERENDSEN, KONING, et al., 2016; KRAWCZYK et al., 2016).

Durante o armazenamento dos pães, os esporos encontram condições ideais para germinar (temperatura acima de 25 °C, atividade de água  $\geq 0,95$ , pH > 5) e produzir enzimas (ROSENKVIST e HANSEN, 1995). O *B. amiloliquefaciens*, *B. subtilis* e *B. licheniformis* têm sido associados com as características do pão estragado, devido à produção de enzimas proteolíticas e amilolíticas e à formação de polissacarídeo extracelular, causando a deterioração da textura do pão e o aumento da viscosidade (ROSENKVIST e HANSEN, 1995; SOROKULOVA et al., 2003; VALERIO et al., 2012; VALERIO et al., 2015). Além da deterioração do pão, algumas linhagens de *Bacillus* como *B. cereus*, *B. licheniformis* e *B. amiloliquefaciens* liberam metabólitos tóxicos que podem causar doenças transmitidas por alimentos (FROM et al., 2007; DE BELLIS et al., 2015).

A utilização do *sourdough*, uma massa fermentada naturalmente ou por adição de uma cultura iniciadora (bactérias de ácido láctico (BAL) e / ou levedura) é uma alternativa importante para prolongar a vida útil dos produtos de panificação. Os

ácidos orgânicos e os compostos antimicrobianos produzidos pelas BALs retardam o crescimento dos *Bacillus* (VALERIO et al., 2008; CHOI et al., 2012; VALERIO et al., 2012). Além disso, o uso do *sourdough* garante melhor qualidade sensorial e redução de compostos antinutricionais como os fitatos (NEYSENS e DE VUYST, 2005; GÄNZLE, 2014; MANINI et al., 2016; CAVALLO et al., 2017).

O *Lactobacillus reuteri* é uma bactéria ácido tolerante, a qual foi isolada e demonstrou boa estabilidade em *sourdoughs* (GANZLE e VOGEL, 2003; MEROTH et al., 2003). O *L. reuteri* LTH2584 e 3028 demonstraram a capacidade de sintetizar a reuteromicina, o único antimicrobiano de baixa massa molar produzido por *lactobacillus* (GÄNZLE et al., 2000; GANZLE, 2004). Ele atua como proton-ionóforo na membrana citoplasmática de bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecium*, *Clostridium difficile* e *Bacillus subtilis* (GANZLE e VOGEL, 2003; HURDLE et al., 2011). No entanto, até o momento, a sua eficácia na redução ou inibição do *rope spoilage* em pão ainda não foi estudada.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do número de cópias do *operon* spoVA<sup>2mob</sup> na resistência térmica do *Bacillus* inoculado em pães e determinar o impacto da adição do *sourdough* e da reuteromicina na redução do *rope spoilage* em pão de trigo.

## 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.2.1 Cepas e condições de culturas

Ambas as cepas de *L. reuteri* (produtora-LTH 3028 e não produtora de reuteromicina-3552) foram inoculadas em caldo Man, Rogosa e Sharpe modificado (mMRS), a 37 °C em condições anaeróbicas durante 18h. Cada litro de mMRS continha 10 g de triptona, 10 g de maltose, 5 g de glucose, 5 g de frutose, 5 g de extrato de carne, 5 g de extrato de levedura, 4,0 g de fosfato de potássio dibásico, 2,6 g de fosfato de potássio monobásico, 2 g de citrato tri-amônio 0,5 g de cisteína, 0,2 g de sulfato de magnésio, 0,05 g de sulfato de manganês, 1 g de Tween 80 e 1 mL de mistura de vitaminas contendo 0,5 µg de vitaminas B1, B2, B6, B12, ácidos fólico e pantotênico.

O *B. subtilis* (0 operon-2114; 1 operon-2001; 2 operons-2002), *B. cereus* (1 operon-2120) e *B. amiloliquefaciens* (2 operon-2154 e 3 operon-2004) foram inoculados em caldo Luria-Bertani (LB) a 37 °C com agitação de 200 rpm.

#### 5.2.2 Produção da suspensão de esporos

Para obtenção da suspensão de esporos dos *Bacillus*, 100 µL das culturas crescidas no caldo LB foram inoculadas na superfície de placas de petri com ágar LB modificado (ALBm) (Biokar 157 diagnostics) suplementado com CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O (100 mg L<sup>-1</sup>) e MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O (50 mg L<sup>-1</sup>) e incubados a 37 °C por 5-7 dias, sendo a formação de esporos acompanhada microscopicamente. Os esporos foram colhidos esfregando a camada bacteriana e lavando as placas com água destilada por três etapas sucessivas. A suspensão foi centrifugada a 3.000 x g por 15 min a 5 °C por três vezes e entre a segunda e terceira centrifugação, as suspensões foram aquecidas a 80 °C por 10 min, para eliminação das células vegetativas remanescentes.

O sedimento final foi suspenso num volume mínimo de água destilada estéril para obter log 10<sup>10</sup> esporos mL<sup>-1</sup> e incubado a -85 °C até a utilização.

#### 5.2.3 Produção de Pão e Inoculação *Bacillus*

Os pães foram preparados misturando 500 g de farinha de trigo, 300 g de água estéril, 10 g de levedura, 10 g de sal e 10 g de açúcar. Todos os ingredientes foram misturados em um amassador em espiral (KitchenAid K45SS, Hobart Co. Troy, OH) por 17 min, (velocidade 2 por 2 min e velocidade 5 por 12 min). As massas foram fermentadas a 25 °C por 60 min, em seguida laminadas e contaminadas com os esporos, sendo espalhados 100 µL de cada suspensão de esporos em cada pão, com o auxílio de uma alça de *Drigalski* estéril. Em seguida, as massas foram moldadas, fermentadas pela segunda vez a 30 °C por 60 min, assadas em forno (Bakers Pride, Lachine, QC, Canadá), a uma temperatura de 150 °C durante 20 min e resfriadas a 25 °C por 90 min.

Os pães contaminados com *B. cereus* foram produzidos no laboratório de microbiologia e assado em estufa de secagem a 150 °C por 40 min, a fim de evitar contaminação com patógenos no laboratório de alimentos.

Ao final das etapas da primeira e segunda fermentação e resfriamento, foram coletadas uma amostra para a contagem de células viáveis e esporos. Após o resfriamento, foram coletadas mais duas fatias de cada pão para avaliação do pH e da evolução do *rope spoilage*.

Para a produção do pão controle, foi utilizada a mesma metodologia descrita acima, não sendo realizada apenas a etapa de contaminação com os *Bacillus*.

#### 5.2.3.1 Contagem de células vegetativas e de esporos de *Bacillus*

As células vegetativas e os esporos foram quantificados diluindo 10 g do miolo do pão em 90 ml de solução salina de peptona (0,1%) e homogeneizadas em *Stomacher* por 2 min. A distinção entre células vegetativas e esporos foi realizada após um tratamento térmico preliminar (80 °C por 10 min) para eliminação das células vegetativas e ativação dos esporos. A amostra foi diluída decimalmente, espalhada 100 µL em placas com ágar LB e incubada a 37 °C. Por 24-48h

#### 5.2.3.2 Avaliação do pH

O pH foi mensurado diluindo 10 g da amostra em 90 mL de água destilada e determinado por um pHmetro (modelo star a 211, Orion, EUA)

#### 5.2.4 Avaliação do *rope spoilage*

Para avaliação do *rope spoilage*, duas fatias de cada pão foram armazenadas em caixas herméticas a 30 °C, com uma umidade controlada a 0,95, por meio da adição de solução salina a 8,25% (m m<sup>-1</sup>). Os pães sem a adição do *sourdough* foram avaliados visualmente e quanto o aparecimento do aroma frutado durante sete dias. Nos pães com a adição do *sourdough*, também foram realizadas contagem de células vegetativas e de esporos de *Bacillus* nos dias 0, 2, 5 e 7 de armazenamento.

##### 5.2.4.1 Avaliação visual e aroma frutado

Diariamente as fatias de pães foram avaliadas quanto ao aparecimento do aroma frutado (como abacaxi), liga/fios e linhas escuras e/ou pela separação das camadas caracterizada pelo aparecimento de “buracos”, as quais indicavam a degradação do amido e/ou glúten.

### 5.2.5 Produção do *sourdough*

As cepas de *L. reuteri* (LTH 3028 e 3552) cultivadas em mMRS foram centrifugadas a 4 °C, por 5 min.; lavadas com 10mL de água estéril e ressuspensas em 50 mL de água da torneira estéril, para adição no *sourdough*.

As massas foram preparadas misturando-se 50 g de farinha de trigo com 50 mL da cultura de células e fermentadas a 30 °C por 24 horas. A concentração inicial e final de células viáveis foi determinada por plaqueamento de diluições apropriadas em ágar mMRS e incubadas a 37 °C durante 24 h em jarra de anaerobiose.

Após a fermentação, os *sourdoughs* foram mensurados quanto ao pH (conforme item 5.2.3.2), liofilizados (Liofilizador modelo 7750000, Labconco, Missouri, EUA) e congelados a -20 °C até a utilização.

Para a produção dos pães com *sourdough*, foram utilizadas as concentrações 3, 6, 12 e 24% de *sourdoughs* liofilizados adicionados a farinha de trigo. As demais etapas de produção dos pães e inoculação dos *Bacillus* foram realizadas conforme descrito no item 5.2.3.

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

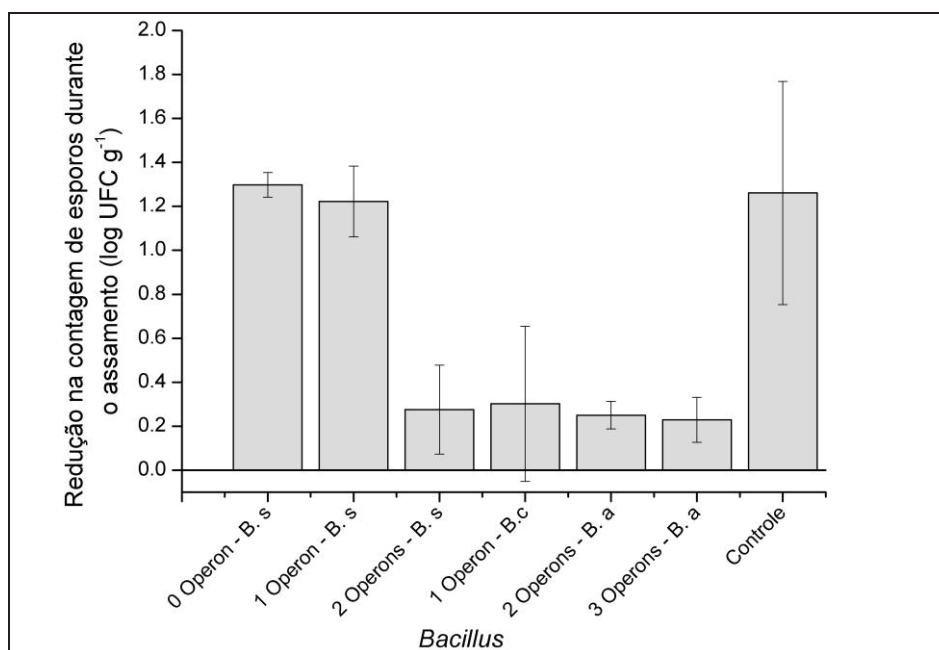
### 5.3.1 Influência da quantidade do *operon spoVA<sup>2mob</sup>* na resistência térmica do *Bacillus* e no desenvolvimento do *rope spoilage*

Como pode ser observado na Figura 1, o *B. subtilis* com 0 e 1 *operon spoVA<sup>2mob</sup>* apresentaram resultados estatisticamente similares, com as maiores reduções na contagem de esporos viáveis durante o processo térmico (em média 1,3 log UFC g<sup>-1</sup>). Ao aumentar a quantidade de *operons* para 2, a resistência térmica também aumentou, obtendo em média uma redução de apenas 0,3 log UFC g<sup>-1</sup>. Para o *B. amiloliquefaciens* com 2 e 3 *operons* ambas tiveram baixas reduções na concentração de esporos, o qual foi estatisticamente similar ao *B. subtilis* com 2 *operons*. Estes resultados indicam que o aumento de 0 ou 1 para 2 *operons spoVA<sup>2mob</sup>*, influenciou na resistência do *Bacillus* ao processo de assamento de pães, concordando com Berendenson *et al.* (2016).

A massa controle teve uma redução média de 1,20 log UFC g<sup>-1</sup>, apesar do alto desvio padrão o comportamento é similar aos *B. subtilis* com 0 e 1 *operon*. O alto desvio padrão pode ser justificado pela ausência de inoculação de *Bacillus*,

desta forma, a diversidade na microbiota da farinha e as variações sofridas pelas massas durante a produção, possuem maior influência nos resultados finais que nas massas contaminadas com alta carga microbiana (em média  $9,20 \log \text{UFC g}^{-1}$ ).

FIGURA 1 : REDUÇÃO NA CONTAGEM DE ESPOROS DURANTE O PROCESSO DE ASSAMENTO DE PÃES CONTAMINADOS COM *Bacillus* COM DIFERENTES QUANTIDADE DO OPERON *spoVA* <sup>2mob</sup>



B.s=*Bacillus subtilis*; B.c=*B. cereus* ; B.a=*B. amiloliquefaciens*

As reduções máximas nas contagens dos esporos dos *Bacillus* representam em um declínio de aproximadamente 14% do inóculo inicial, resultados similares aos obtidos por Sorokulova *et al.* (2003). Durante o processo de assamento, a temperatura interna do miolo atinge 97-100 °C por poucos minutos (FARMILOE *et al.*, 1954). Neste trabalho, a temperatura de assamento utilizada foi de 150 °C e verificou-se que no centro do miolo com 8 min a temperatura atingiu 80 °C e nos próximos 2 min aumentou para 90 °C, e manteve praticamente estável em 95 °C - 97 °C entre 15 e 20 min. Os esporos, de forma geral, germinam em temperaturas entre 65-85 °C e podem sobreviver a 100 °C por alguns minutos, além disso, a matriz do alimento também atua protegendo os *Bacillus* (ROSENKVIST e HANSEN, 1995; FERNANDEZ *et al.*, 2001; LUU *et al.*, 2015; VALERIO *et al.*, 2015). Berendes *et al.* (2016) utilizaram a temperatura de 100 °C por 1h e obtiveram uma redução na contagem de esporos viáveis de *B. subtilis* e *amiloliquefaciens* com 3 operon de apenas 1 log durante todo o processo e somente os *Bacillus* com 0 operon que

foram inibidos completamente. Estes resultados mostram que o processo de assamento não é capaz de inibir uma alta contaminação de *Bacillus*.

A massa contaminada com o *B. cereus* com 1 *operon spoVA<sup>2mob</sup>* mostrou um alto desvio padrão e com uma baixa redução na contagem, similar aos *Bacillus* com 2 e 3 *operons*. Estes resultados foram devido ao processo térmico (assamento) ter sido realizado em estufa de secagem sem circulação de ar. A temperatura da estufa sofreu oscilações durante todo o processo e mesmo com o aumento no tempo de assamento de 20 para 45 min, a temperatura máxima alcançada no miolo dos pães foi de 87 °C, não sendo o suficiente para a inativação de esporos.

Em relação ao desenvolvimento do *rope spoilage*, a primeira característica observada é a presença do aroma frutado, como de abacaxi ou melão maduro, seguido pela discoloração e alterações no miolo e por último a “liquefação” ou formação de liga/fios (VON HOLY e ALLAN, 1990; THOMPSON *et al.*, 1993).

Na Tabela 1, verifica-se que todos os pães apresentaram o aroma frutado após 1 dia de armazenamento.

TABELA 1 - DIA DE INÍCIO DE CADA CARACTERÍSTICA DO *ROPE SPOILAGE* NOS PÃES CONTAMINADOS COM *Bacillus* (COM DIFERENTES QUANTIDADES DO *OPERON spoVA<sup>2mob</sup>*) ARMAZENADOS A 30 °C E *aw* DE 0,95

Caracterist. <sup>1</sup>	Cepa						Cont. <sup>3</sup>
	<i>B. subtilis</i> 0 operon	<i>B. subtilis</i> 1 operon	<i>B. cereus</i> 1 operon	<i>B. subtilis</i> 2 operons	<i>B. amil</i> 2 operons <sup>2</sup>	<i>B. amil.</i> 3 operons <sup>2</sup>	
Aroma frutado	1	1	1	1	1	1	1
Linhas e separação das camadas	4	3	5	3	2	2	3
Miolo pegajoso	5	4	3	4	3	3	4
Formação de liga/fios	5	5	4	5	4	3	5

1)Características; 2) *Bacillus amiloliquefaciens*; 3) Controle

Nos pães com os *B. amiloliquefaciens* também foi identificada a presença de linhas mais escuras e da separação das camadas com 2 dias (Figura 2) e com 3 dias o miolo tornou-se pegajoso ou mole, indicando a produção de enzimas amilolíticas e a degradação da textura. A diferença no desenvolvimento do *rope spoilage* entre as duas cepas de *B. amiloliquefaciens* foi na formação de liga/fios, característica observada no 3° dia no *Bacillus* com 3 *operons* e no 4° dia no *Bacillus* com 2 *operons*, indicando que o aumento do *operon spoVA<sup>2mob</sup>* acelerou o processo de *rope spoilage*. Na Figura 3 é apresentando um exemplo da formação de liga/fios.



FIGURA 2 – EVOLUÇÃO DO ROPE SOILAGE EM PÃES CONTAMINADOS COM *Bacillus* COM DIFERENTES QUANTIDADES DO OPERON *spoVA<sub>2mob</sub>* continua





























	1°	2° dia	3° dia	4° dia	5° dia	6° dia	7° dia
Controle							
0 operon <i>B. subtilis</i>							
1 operon <i>B. subtilis</i>							
2 operons <i>B. subtilis</i>							



FIGURA 2 – EVOLUÇÃO DO ROPE EM PÃES CONTAMINADOS COM *Bacillus* COM DIFERENTES QUANTIDADES DO OPERON *spoVA*<sup>2mob</sup> conclusão
















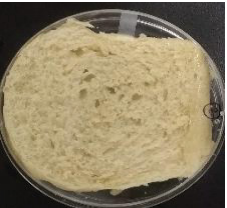
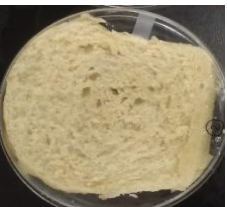




	1° dia	2° dia	3° dia	4° dia	5° dia	6° dia	7° dia
2 operons <i>B. amiloliquefaciens</i>							
3 operons <i>B. amiloliquefaciens</i>							
1 operon <i>B. cereus</i>							

FIGURA 3 – FORMAÇÃO DE LIGA/FIOS DURANTE A DEGRADAÇÃO POR *ROPE SPOILAGE* POR *Bacillus*



O *B. subtilis* com 2 *operons* mostrou uma degradação similar ao *B. subtilis* com 1 *operon* e ao controle, e mais lenta que a apresentada pelo *B. amiloliquefaciens* com 2 *operons*, indicando diferença na germinação dos esporos e/ou na produção de enzimas extracelulares dos *Bacillus* de espécies diferentes, mas com mesma quantidade de *operon*. Já, o *Bacillus subtilis* com 0 *operon* mostrou a degradação mais lenta, indicando que apesar da diferença entre as duas espécies a quantidade do *operon spoVa<sup>2mob</sup>* teve grande influência na velocidade do desenvolvimento do *rope spoilage*. No pão com o *B. subtilis* com 1 *operon* também foi identificada o desenvolvimento de uma coloração mais escura, a qual é característica de algumas espécies deste *Bacillus* que produzem pigmentos marrons e pretos em meios ricos em amidos, devido a oxidação da tirosina (NAKAMURA, 1989).

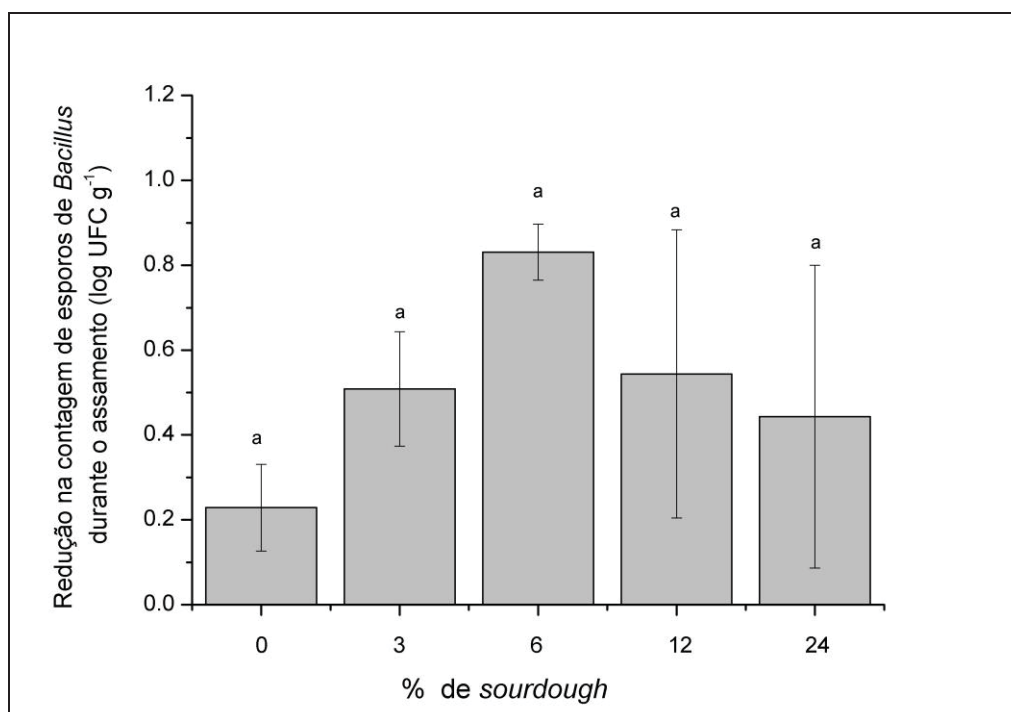
O pão com a adição do *B. cereus* apresentou um comportamento totalmente diferente dos demais pães, sendo o miolo pegajoso e a liga/fios identificados antes da produção de linhas e da separação das camadas. Estes resultados podem ter sido influenciados pelo processo térmico, já que nos pães assados não foi observada a formação da coloração e da crosta, indicando uma maior umidade no pão e menor temperatura de assamento (conforme discutido acima).

Como o *B. amiloliquefaciens* 2004 (com 3 *operons*) mostrou a degradação pelo *rope spoilage* mais rápida, este micro-organismo foi o utilizado nas etapas seguintes de avaliação da influência do *sourdough* e da reuteriicina

### 5.3.2 Influência da adição do *sourdough* fermentado com *Lactobacillus reuteri* e da reutericiclina na redução do *rope spoilage*

O *sourdough* liofilizado (reutericiclina negativo) adicionado nas concentrações de 3, 6, 12 e 24% não teve efeito significativo na resistência térmica dos esporos (Figura 4). Estes resultados já eram esperados visto que a estrutura dos esporos é formada por multicamadas de proteínas e lipídios que garantem a sobrevivência destes mesmo em condições extremas, como tratamentos químicos, altas temperaturas e radiação UV (SETLOW, 1992; 2006) e a concentração de ácidos presentes nos pães, devido a adição do *sourdough*, é baixa. Porém, ao encontrarem condições favoráveis de crescimento, os esporos saem do estado de dormência e iniciam o processo de multiplicação e produção de enzimas (COWAN *et al.*, 2003), os quais são responsáveis pelo desenvolvimento do *rope spoilage*.

FIGURA 4 : REDUÇÃO NA CONTAGEM DE ESPOROS DURANTE O PROCESSO DE ASSAMENTO DE PÃES CONTAMINADOS COM *Bacillus amiloliquefaciens* 2004 E ADICIONADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *SOURDOUGH*



Na Tabela 2 são apresentados os resultados referentes a degradação dos pães adicionados com diferentes concentrações de *sourdough* sem reutericiclina, pelo *B. amiloliquefaciens* 2004.

TABELA 2 – INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE  *SOURDOUGH* FERMENTADO COM  *Lactobacillus reuteri* NO APARECIMENTO DO  *ROPE SPOILAGE* (DIAS) EM PÃES CONTAMINADOS COM  *Bacillus amiloliquefaciens* 2004 E ARMAZENADOS A 30 °C E AW DE 0,95

Características	Concentração de <i>sourdough</i>				
	0	3	6	12	24
pH	6,40±0,02	6,31±0,04	6,17±0,03	5,93±0,02	5,32±0,01
Aroma frutado	1	1	2	2	nd
Linhas e separação das camadas	2	2	2	2	nd
Miolo pegajoso	3	3	3	4	nd
Formação de liga/fios	3	3	3	4	nd

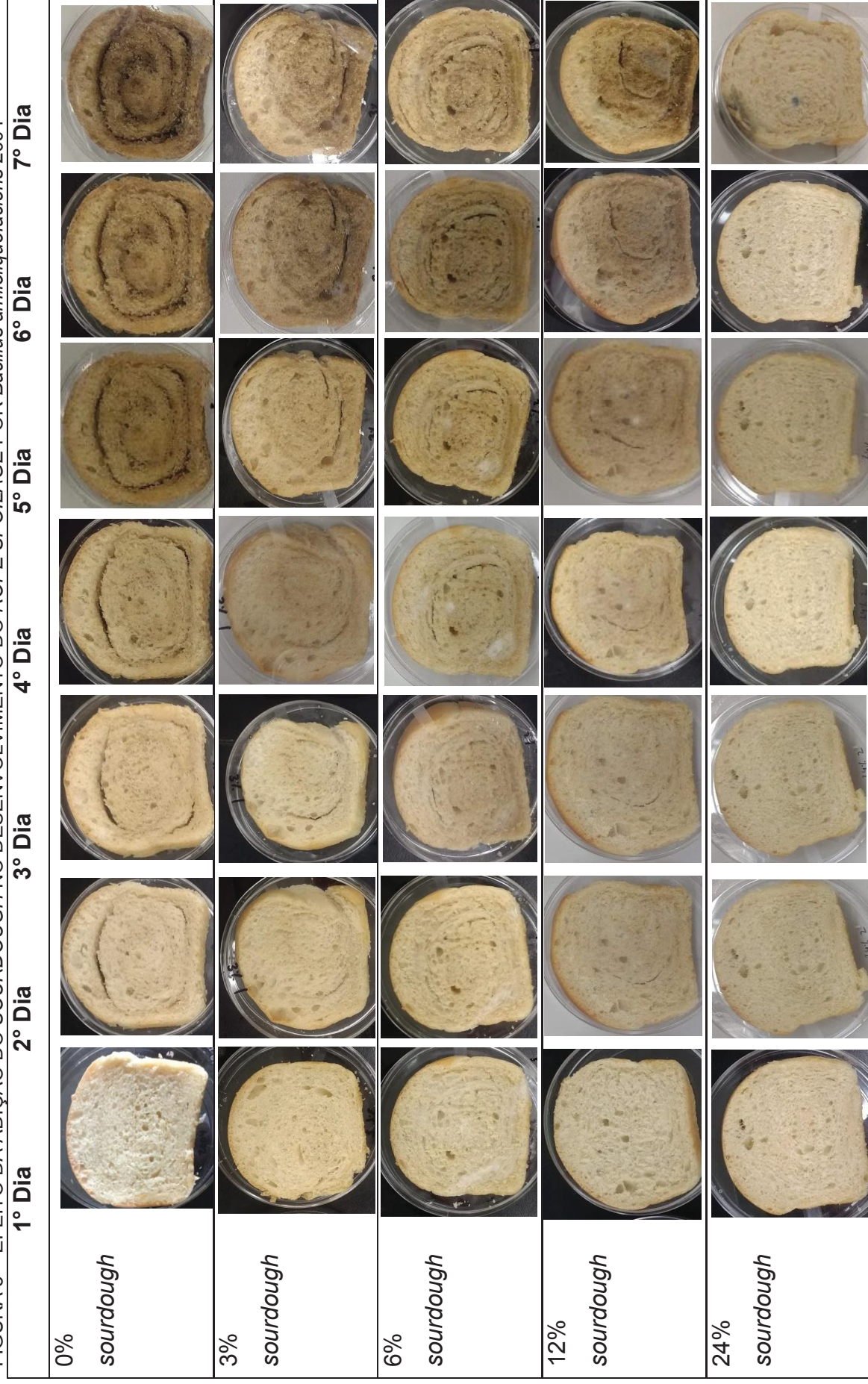
nd = não identificado

Avaliando o efeito da adição do *sourdough* no *rope spoilage*, observa-se que o desenvolvimento do aroma frutado, foi dificultado a partir da adição de 6% de *sourdough* aparecendo a partir do 2° dia de armazenamento. Em relação a degradação da textura com a formação de linhas e a separação das camadas, todos os pães com até 12% de *sourdough* apresentaram esta característica também a partir 2° dia. Contudo, observando a Figura 5 verifica-se que ao aumentar a concentração do *sourdough* as linhas tornavam-se menos evidentes, indicando uma maior dificuldade dos esporos germinarem e produzirem enzimas extracelulares. Concordando com isto, observa-se que com 12% de *sourdough* teve-se a redução na formação de fios/ligas, característica observada apenas no 4° dia de armazenamento. Considerando a alta concentração de *Bacillus* termo resistentes adicionados (em média 9 log UFC g<sup>-1</sup>), esses são dados importantes pois mostram que a adição do *sourdough*, mesmo em concentrações baixas como 6 e 12%, é efetiva no aumento do *shelf-life* e na prevenção do *rope spoilage* em pães.

Com a adição máxima de *sourdough* (24%), o pH reduziu para 5,32 ±0,01 valor ainda considerado ideal para o crescimento do *B. amiloliquefaciens* (5,0-7,0) (VALERIO *et al.*, 2015), contudo nenhuma das características referentes ao *rope spoilage* foi identificada neste pão. Após 7 dias de avaliação observou-se o crescimento de mofo (Figura 5) e por isso as fatias foram descartadas. Os resultados deste estudo concordam com outros trabalhos que evidenciaram a redução no crescimento de *Bacillus* e no desenvolvimento do *rope spoilage* em pães adicionados de *sourdough* (KATINA *et al.*, 2002; MENTEŞ *et al.*, 2007; MANTZOURANI *et al.*, 2019).



FIGURA 5 – EFEITO DA ADIÇÃO DO SOURDOUGH NO DESENVOLVIMENTO DO ROPE SPOILAGE POR *Bacillus amyloliquefaciens* 2004



Para avaliar o efeito da reuteriicina na inibição do *rope spoilage* pelo *B. amyloliquefaciens* 2004, foi utilizada a concentração de 12% de *sourdough*. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.

TABELA 3 – EFEITO DA REUTERICICLINA NA PREVENÇÃO DO ROPE SPOILAGE (DIAS) EM PÃES CONTAMINADOS COM *Bacillus amyloliquefaciens* 2004 E ARMAZENADOS A 30 °C E Aw DE 0,95

Características	Reuteriicina negativa	Reuteriicina positiva
pH	5,93±0,02	5,92±0,01
Aroma Frutado	2	3
Linhas e separação das camadas	3	5
Miolo pegajoso	4	5
Formação de liga/fios	4	7

O aroma frutado foi identificado no pão com *sourdough* sem reuteriicina no 2° dia de armazenamento e com 4 dias este pão já apresentava todas as características referentes ao *rope spoilage*. Contudo com a presença da reuteriicina, o aroma frutado apareceu apenas no 3° dia, e a degradação da textura iniciou no 5° dia e somente no 7° dia que a formação de fios e ligas se tornou evidente. Como ambos os pães apresentavam pH similares e foram submetidos aos mesmos processos de produção e armazenamento podemos afirmar a adição da reuteriicina retardou o aparecimento do *rope spoilage* no pão contaminado com *B. amyloliquefaciens* com 3 *operons spoVa*<sup>2mob</sup>.

#### 5.4 CONCLUSÕES

Com este estudo preliminar, verificou-se que ao aumentar a quantidade do *operon spoVa*<sup>2mob</sup> aumentou-se também a resistência térmica do *Bacillus* e acelerou-se o desenvolvimento do *rope spoilage* em pães. Com a adição do *sourdough*, foi observada uma redução na degradação sendo que com 24% o *rope spoilage* não foi identificado até o 7° dia de armazenamento. Além disso, os resultados deste trabalho identificaram que a reuteriicina possui efeito positivo na redução do *rope spoilage*. Entretanto mais estudos nesta área precisam ser desenvolvidos a fim de quantificar a concentração de reuteriicina presente no *sourdough* utilizado e determinar a concentração ideal de utilização.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, verificou-se que:

- ✓ Com cinco dias de fermentação o *sourdough* tradicional alcançou a estabilidade dos parâmetros tecnológicos, estruturais e bioquímicos;
- ✓ A *Lactobacillus reuteri* produziu um *sourdough* tipo II com valor ideal de Quociente de Fermentação. Já, a *L. amilovor* *L. brevis* e *P. pentosaceus* produziram um *sourdough* com bom perfil aromático;
- ✓ A fermentação do *sourdough* tipo II com apenas 1 BAL não produziu uma massa com boas características tecnológicas e aromáticas;
- ✓ As características do *sourdough* tipo II, fermentado pela adição em co-cultivo de BAL, apresentaram grande influência da cultura iniciadora e da temperatura de fermentação utilizada;
- ✓ Com a temperatura de 28 °C obteve-se em geral, maior concentração de leveduras, consumo de glicose, produção de CO<sub>2</sub>, pH mais alto, e menor valor de quociente de fermentação que a 35 °C. Nos compostos aromáticos observou-se maior concentração de ésteres a 35 °C;
- ✓ No pão produzido com *sourdough* verificou-se uma forte correlação negativa entre o pH e a dureza, sendo que o pão adicionado dos *sourdough* fermentados com *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. amilovor* e da *L. brevis* e *L. plantarum* a 28 °C apresentaram os menores pH e maiores dureza;
- ✓ O pão controle (sem *sourdough*) e o adicionado do *sourdough* fermentado com *brevis* e *L. plantarum* a 35 °C obtiveram o valor de dureza estatisticamente semelhantes;
- ✓ A adição do *sourdough* aumentou a concentração de compostos aromáticos no pão;
- ✓ O aumento da quantidade do operon *spoVA<sup>2mob</sup>* aumentou a resistência térmica dos *Bacillus*;
- ✓ A adição do *sourdough* retardou o aparecimento do *rope spoilage* por *Bacillus*, aumentando o *shelf-life* dos produtos de panificação;
- ✓ A reuteriicina possui efeito positivo no aumento do *shelf-life* de pães.



## 6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliação da concentração de glúten durante a fermentação do *sourdough* tradicional;
- ✓ Avaliar as alterações estruturais de *sourdough* tipo II adicionado de diferentes culturas iniciadoras;
- ✓ Avaliar o impacto da temperatura de fermentação na estrutura do *sourdough* tipo II
- ✓ Estudar a concentração ideal de reuteriicina para inibir o aparecimento do *rope spoilage*.

## REFERÊNCIAS

ABEGAZ, K. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria involved in traditional fermentation of borde, an ethiopian cereal beverage. **International Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 1, n. 1, p. 07-15, 2014.

ABI, W. **Brazilian Association of Wheat Industries. Statistics - import-export of wheat flour.** [http://www.abitrigo.com.br/associados/arquivos/importacao\\_trigo.pdf](http://www.abitrigo.com.br/associados/arquivos/importacao_trigo.pdf) 2017.

AGUILAR, N.; ALBANELL, E.; MIÑARRO, B.; CAPELLAS, M. Chestnut flour sourdough for gluten-free bread making. **European Food Research Technology**, , 2016. doi:10.1007/s00217-016-2679-z

ALEXANDRE, H.; GUILLOUX-BENATIER, M. Yeast autolysis in sparkling wine—a review. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, p. 119-127, 2006. doi:10.1111/j.1755-0238.2006.tb00051.x

ALFONZO, A.; URSO, V.; CORONA, O.; FRANCESCA, N.; AMATO, G.; SETTANNI, L.; DI MICELI, G. Development of a method for the direct fermentation of semolina by selected sourdough lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 65-78, Dec 19 2016. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.027

ALFONZO, A.; MICELI, C.; NASCA, A.; FRANCIOSI, E.; VENTIMIGLIA, G.; DI GERLANDO, R.; TUOHY, K.; FRANCESCA, N.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Monitoring of wheat lactic acid bacteria from the field until the first step of dough fermentation. **Food Microbiology**, v. 62, p. 256-269, Apr 2017. doi:10.1016/j.fm.2016.10.014

APONTE, M.; BOSCAINO, F.; SORRENTINO, A.; COPPOLA, R.; MASI, P.; ROMANO, A. Volatile compounds and bacterial community dynamics of chestnut-flour-based sourdoughs. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2394-404, Dec 01 2013. doi:10.1016/j.foodchem.2013.05.052

ARENDT, E. K.; RYAN, L. A.; DAL BELLO, F. Impact of sourdough on the texture of bread. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 165-74, Apr 2007. doi:10.1016/j.fm.2006.07.011

AXEL, C.; BROSNAN, B.; ZANNINI, E.; FUREY, A.; COFFEY, A.; ARENDT, E. K. Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 86-94, Dec 19 2016. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.006

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S. e VON WRIGHT, A. (Ed.). **Lactic acid bacteria microbiology and functional aspects**. New York: Marcel Dekker, 1999. p.1-72.

BARBER, B.; ORTOLH, C.; BARBER, S.; FERNANDEZ, F. Storage of packaged white bread. **Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung**, v. 194, 1992.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. Berlin: Springer, 2008.

BENEDICKT, G.; MEYER, B. **Die Geschichte der Backmittel, Backmittel**, 2003. Disponível em: < [https://wissensforum-backwaren.de/wp-content/uploads/11\\_Die-Geschichte-der-Backmittel.pdf](https://wissensforum-backwaren.de/wp-content/uploads/11_Die-Geschichte-der-Backmittel.pdf) >. Acesso em: 25, july.

BERENDSEN, E. M.; BOEKHORST, J.; KUIPERS, O. P.; WELLS-BENNIK, M. H. A mobile genetic element profoundly increases heat resistance of bacterial spores. **ISME J**, v. 10, n. 11, p. 2633-2642, Nov 2016. doi:10.1038/ismej.2016.59

BERRY, D. R.; WATSON, D. C. Production of organoleptic compounds. In: BERRY, D. R.; RUSSELL, I., *et al* (Ed.). **Yeast Biotechnology**. London: Allen and Unwin, 1987.

BIANCHI, F.; CARERI, M.; CHIAVARO, E.; MUSCI, M.; VITTADINI, E. Gas chromatographic-mass spectrometric characterisation of the Italian protected designation of origin "Altamura" bread volatile profile. **Food Chemistry**, v. 110, p. 787-793, 2008.

BIRCH, A. N.; PETERSEN, M. A.; HANSEN, Å. S. REVIEW: Aroma of Wheat Bread Crumb. **Cereal Chemistry**, v. 91, n. 2, p. 105-114, 2014. doi:10.1094/cchem-06-13-0121-rw

BLACK, B. A.; ZANNINI, E.; CURTIS, J. M.; GÄNZLE, M. G. Antifungal hydroxy fatty acids produced during sourdough fermentation: microbial and enzymatic pathways, and antifungal activity in bread. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, p. 1866-1873, 2013.

BÖCKER, G.; STOLZ, P.; HAMMES, W. P. Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie des Sauerteig-typischen Stammes *Lactobacillus sanfranciscensis* und *Lactobacillus pontis*. . **Getreide Mehl Brot**, v. 49, 1995.

BORGES, O. P.; SOEIRO CARVALHO, J.; REIS CORREIA, P.; PAULA SILVA, A. Lipid and fatty acid profiles of *Castanea sativa* Mill. Chestnuts of 17 native Portuguese cultivars. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 2, p. 80-89, 2007. doi:10.1016/j.jfca.2006.07.008

BRANDT, M. J. Sourdough products for convenient use in baking. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 161-4, Apr 2007. doi:10.1016/j.fm.2006.07.010

BRANDT, M. J.; HAMMES, W. P.; GÄNZLE, M. G. Effects of process parameters on growth and metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida humilis* during rye sourdough fermentation. . **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 333–338, 2004.

BRIJS, K.; BLEUKX, W.; DELCOUR, J. A. Proteolytic activities in dormant rye (*Secale cereale* L.) grain. . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, 1999.

BUREŠOVÁ, I.; MASAŘÍKOVÁ, L.; HŘIVNA, L.; KULHANOVÁ, S.; BUREŠ, D. The comparison of the effect of sodium caseinate, calcium caseinate, carboxymethyl cellulose and xanthan gum on rice-buckwheat dough rheological characteristics and textural and sensory quality of bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 659-666, 2016. doi:10.1016/j.lwt.2016.01.010

BURTON, P.; LIGHTOWLER, H. J. Influence of bread volume on glycaemic response and satiety. **British Journal of Nutrition**, v. 96, n. 05, 2007. doi:10.1017/bjn20061900

CAMPO, E.; DEL ARCO, L.; URTASUN, L.; ORIA, R.; FERRER-MAIRAL, A. Impact of sourdough on sensory properties and consumers' preference of gluten-free breads

enriched with teff flour. **Journal of Cereal Science**, v. 67, p. 75-82, 2016. doi:10.1016/j.jcs.2015.09.010

CAPPELLE, S.; GUYLAINE, L.; GÄNZLE, M.; GOBBETTI, M. History and Social Aspects of Sourdough. In: GOBBETTI, M. e GÄNZLE, M. (Ed.). **Handbook on sourdough biotechnology**. Germany: Springer, v.1, 2013.

CHAOUI, A.; FAID, M.; BELHCEN, R. Effect of natural starters used for sourdough bread in Morocco on phytate biodegradation. **Eastern Mediterranean Health Journal**, v. 9, p. 141-147, 2003.

CHAVAN, R. S.; CHAVAN, S. R. Sourdough Technology-A Traditional Way for Wholesome Foods: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 3, p. 169-182, 2011. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00148.x

CHEN, X. Y.; LEVY, C.; GANZLE, M. G. Structure-function relationships of bacterial and enzymatically produced reuterans and dextran in sourdough bread baking application. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 95-102, Dec 19 2016. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.010

CLARKE, I. C.; SCHOBER, J. T.; DOCKERY, P.; O'SULLIVAN, K.; ARENDT, K. E. Wheat Sourdough Fermentation: Effects of Time and Acidification on Fundamental Rheological Properties. **Cereal Chemistry**, v. 81, n. 3, 2004. doi:10.1533/9781845690632.5.163

CODA, R.; CAGNO, R. D.; GOBBETTI, M.; RIZZELLO, C. G. Sourdough lactic acid bacteria: exploration of non-wheat cereal-based fermentation. **Food Microbiology**, v. 37, p. 51-8, Feb 2014. doi:10.1016/j.fm.2013.06.018

CODA, R.; RIZZELLO, C. G.; TRANI, A.; GOBBETT, I. M. Manufacture and characterization of functional emmer beverages fermented by selected lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, n. 28, 2011. doi: 10.1016/j.fm.2010.11.001

CODINĂ, G. G.; MIRONEASA, S.; VOIC, D. V.; MIRONEASA, C. Multivariate Analysis of Wheat Flour Dough Sugars, Gas Production, and Dough Development at Different Fermentation Times. **Czech J. Food Science**, v. 31, p. 222-229, 2013.

CODINĂ, G. G.; MIRONEASA, S.; VOICA, V. D.; MIRONEASA, C. Multivariate Analysis of Wheat Flour Dough Sugars, Gas Production, and Dough Development at Different Fermentation Times. **Czech Journal of Food Science**, v. 31, n. 3, 2013.

COLLAR, C.; BENEDITO, D. B. C.; MARTÍNEZ-ANAYA, M. Microbial sourdoughs influence acidification properties and bread-making potential of wheat dough. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 629-633, 1994.

CORONA, O.; ALFONZO, A.; VENTIMIGLIA, G.; NASCA, A.; FRANCESCA, N.; MARTORANA, A.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Industrial application of selected lactic acid bacteria isolated from local semolinas for typical sourdough bread production. **Food Microbiology**, v. 59, p. 43-56, Oct 2016. doi:10.1016/j.fm.2016.05.006

CORSETTI, A. Technology of sourdough fermentation and sourdough applications. In: CAPPELLE, S.; GUYLAINE, L., *et al* (Ed.). **Handbook on sourdough biotechnology**. Germany Springer, v.1, 2013.

CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; BALESTRIERI, F.; PAOLETTI, F.; RUSSI, L.; ROSSI, J. Sourdough Lactic Acid Bacteria Effects on Bread Firmness and Staling. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 2, 1998.

CORSETTI, A.; GOBBETTI, M.; DE MARCO, B.; BALESTRIERI, F.; PAOLETTI, F.; RUSSI, L.; ROSSI, J. Combined Effect of Sourdough Lactic Acid Bacteria and Additives on Bread Firmness and Staling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3044-3051, 2000.

CORSETTI, A.; LAVERMICOCCA, P.; MOREA, M.; BARUZZI, F.; TOSTIC, N.; GOBBETTI, M. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 95-104, 2001.

CORSETTI, A.; SETTANNI, L. *Lactobacilli* in sourdough fermentation. **Food Research International**, v. 40, n. 5, p. 539-558, 2007. doi:10.1016/j.foodres.2006.11.001

CORTES-ZAVALA, O.; LOPEZ-MALO, A.; HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GARCIA, H. S. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic

acid production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, p. 30-5, Mar 3 2014. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.016

COSTANTINI, L.; LUKSIC, L.; MOLINARI, R.; KREFT, I.; BONAFACCIA, G.; MANZI, L.; MERENDINO, N. Development of gluten-free bread using tartary buckwheat and chia flour rich in flavonoids and omega-3 fatty acids as ingredients. **Food Chemistry**, v. 165, p. 232-40, Dec 15 2014. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.095

COWAN, A. E.; KOPPEL, D. E.; SETLOW, B.; SETLOW, P. A soluble protein is immobile in dormant spores of *Bacillus subtilis* but is mobile in germinated spores: implications for spore dormancy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 4209-14, Apr 1 2003. doi:10.1073/pnas.0636762100

CROWLEY, S.; MAHONY, J.; VAN SINDEREN, D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 33, n. 2, p. 93-109, 2013. doi:10.1016/j.tifs.2013.07.004

CURIEL, J. A.; CODA, R.; CENTOMANI, I.; SUMMO, C.; GOBBETTI, M.; RIZZELLO, C. G. Exploitation of the nutritional and functional characteristics of traditional Italian legumes: the potential of sourdough fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 196, p. 51-61, Mar 02 2015. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.032

CZAJA, T.; MAZUREK, S.; SZOSTAK, R. Quantification of gluten in wheat flour by FT-Raman spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 211, p. 560-3, Nov 15 2016. doi:10.1016/j.foodchem.2016.05.108

DALIÉ, D. K. D.; DESCHAMPS, A. M.; RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 370-380, 2010. doi:10.1016/j.foodcont.2009.07.011

DAVIDOU, S.; LE MESTE, M.; DEBEVER, E.; BEKAERT, D. A contribution to the study of staling of white bread: effect of water and hydrocolloid. **Food Hydrocolloids**, v. 10, p. 375-383, 1996.

DE LAS RIVAS, B.; RODRÍGUEZ, H.; CURIEL, J. A.; LANDETE, M. J.; MUNÖZ, R. Molecular Screening of Wine Lactic Acid Bacteria Degrading Hydroxycinnamic Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 490-494, 2009.



DEMIRBAŞ, F.; İSPIRLİ, H.; KURNAZ, A. A.; YILMAZ, M. T.; DERTLI, E. Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 361-366, 2017. doi:10.1016/j.lwt.2017.01.067

DERTLI, E.; MERCAN, E.; ARICI, M.; YILMAZ, M. T.; SAĞDIÇ, O. Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 116-124, 2016. doi:10.1016/j.lwt.2016.03.030

DE VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters Reviews**, v. 23, p. 153-177, 1999. doi:10.1111/j.1574-6976.1999.tb00395.x.

DE VUYST, L.; HARTH, H.; VAN KERREBROECK, S.; LEROY, F. Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 26-34, Dec 19 2016. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.018

DE VUYST, L.; NEYSENS, P. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1-3, p. 43-56, 2005. doi:10.1016/j.tifs.2004.02.012

DE VUYST, L.; VAN KERREBROECK, S.; HARTH, H.; HUYS, G.; DANIEL, H. M.; WECKX, S. Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? **Food Microbiology**, v. 37, p. 11-29, Feb 2014. doi:10.1016/j.fm.2013.06.002

DE VUYST, L.; VRANCKEN, G.; RAVYTS, F.; RIMAU, T.; WECKX, S. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. **Food Microbiology**, v. 26, p. 666-675, 2009.

DECOCK, P.; CAPPELLE, S. Bread technology and sourdough technology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1-3, p. 113-120, 2005. doi:10.1016/j.tifs.2004.04.012

DENKOVA, R.; ILIEVA, S.; DENKOVA, Z.; GEORGIEVA, L.; YORDANOVA, M.; NIKOLOVA, D.; EVSTATIEVA, Y. Production of wheat bread without preservatives using sourdough starters. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 5, p. 889-898, Sep 03 2014. doi:10.1080/13102818.2014.965057

DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M.; GALLO, G.; SETTANNI, L.; BERLOCO, M. G.; SIRAGUSA, S.; PARENTE, E.; CORSETTI, A.; GOBBETTI, M. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus rossiae* strains isolated from sourdough. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 821-35, Oct 2007. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03389.x

DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M.; LIMITONE, A.; MINERVINI, F.; CARNEVALI, P.; CORSETTI, A.; GÄNZLE, M.; CIATI, R.; GOBBETTI, M. Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9873-9881, 2006.

DIOKWSZ, A.; KORDIALIK-BOGACKA, E.; AMBROZIAK, W. Se-enriched sprouted seeds as functional additives in sourdough fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 524-528, 2014. doi:10.1016/j.lwt.2013.11.023

EDWARDS, W. P. **The Science of Bakery Products**. Cambridge, UK: RSC Publishing, 2007.

ERCOLINI, D.; PONTONIO, E.; DE FILIPPIS, F.; MINERVINI, F.; LA STORIA, A.; GOBBETTI, M.; DI CAGNO, R. Microbial Ecology Dynamics during Rye and Wheat Sourdough Preparation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 24, 2013. doi:0.1128/AEM.02955-13

FADDA, C.; SANGUINETTI, M.; DEL CARO, A.; COLLAR, C.; PIGGA, A. Bread Staling: uptading the view. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 473-492, 2014. doi:10.1111/1541-4337.12064

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations. Crops processed**. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. 2017 2016.

FARMILOE, F. J.; CONFORD, S. J.; COPPOCK, J. B. M.; INGRAM, M. The survival of *Bacillus subtilis* spores in the baking of bread. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 5, p. 292-304, 1954.

FAZELI, M. R.; HAJIMOHAMMADALI, M.; MOSHKANI, A.; SAMADI, N.; JAMALIFAR, H.; KHOSHAYAND, M. R.; VAGHARI, E.; POURAGAH, S. *Aflatoxin B1*

binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 1, p. 189-192, 2009.

FERNANDEZ , A.; OCIO, M. J.; FERNÁNDEZ, P. S.; MARTÍNEZ, A. Effect of heat activation and inactivation conditions on germination and thermal resistance parameters of *Bacillus cereus* spores. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, p. 257–264, 2001.

FRETZDORFF, B.; BRÜMMER, J.-M. Reduction of phytic acid during breadmaking of whole-meal bread. **Cereal Chemistry Journal**, v. 69, p. 266–270., 1992.

FUJISAWA, T.; BENNO, Y.; YAESHIMA, T.; MITSUOKA, T. Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson et al. 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura 1981). **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 3, p. 487-491, 1992.

FUWA, H. A. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylase as the substrate. **The journal of Biochemistry**, v. 41, p. 583-603, 1954.

GAGGIANO, M.; DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M.; ARNAULT, P.; TOSSUT, P.; FOX, P. F.; GOBBETTI, M. Defined multi-species semi-liquid ready-to-use sourdough starter. **Food Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 15-24, Feb 2007. doi:10.1016/j.fm.2006.04.003

GALLE, S.; SCHWAB, C.; DAL BELLO, F.; COFFEY, A.; GANZLE, M. G.; ARENDT, E. K. Influence of in-situ synthesized exopolysaccharides on the quality of gluten-free sorghum sourdough bread. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 3, p. 105-12, Apr 16 2012. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.009

GÄNZLE, G. M.; EHMANN, M.; HAMMES, P. W. Modeling of Growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in Response to Process Parameters of Sourdough Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 7, 1998.

GANZLE, M.; RIPARI, V. Composition and function of sourdough microbiota: From ecological theory to bread quality. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 19-25, Dec 19 2016. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.004

GANZLE, M. G. Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 326-32, Apr 2004. doi:10.1007/s00253-003-1536-8

GÄNZLE, M. G. Enzymatic and bacterial conversions during sourdough fermentation. **Food Microbiology**, v. 37, p. 2-10, Feb 2014. doi:10.1016/j.fm.2013.04.007

GANZLE, M. G.; FOLLADOR, R. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. **Front Microbiol**, v. 3, p. 340, 2012. doi:10.3389/fmicb.2012.00340

GÄNZLE, M. G.; LOPONEN, J.; GOBBETTI, M. Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 10, p. 513-521, 2008. doi:10.1016/j.tifs.2008.04.002

GANZLE, M. G.; VERMEULEN, N.; VOGEL, R. F. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. **Food Microbiol**, v. 24, n. 2, p. 128-38, Apr 2007. doi:10.1016/j.fm.2006.07.006

GÄNZLE, M. G.; VERMEULEN, N.; VOGEL, R. F. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. . **Food Microbiology**, v. 24, p. 128-138, 2007.

GOBBETT , M.; SIMONETTI, M. S.; CORSETTI, A.; SANTINELLI, F.; ROSSI, J.; DAMIANI, P. Volatile compound and organic acid productions by mixed wheat sour dough starters: influence of fermentation parameters and dynamics during baking. **Food Microbiology**, v. 12, p. 497-507, 1995.

GOBBETTI, M. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, 1998.

GOBBETTI, M.; CORSETTI, A. *Lactobacillus sanfrancisco* a key sourdough lactic acid bacterium: a review. **Food Microbiology**, v. 14, 1997.

GOBBETTI, M.; CORSETTI, A.; ROSSI, J. The sourdough microflora interactions between lactic acid bacteria and yeasts: metabolism of carbohydrates. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 41, p. 456-460, 1994.

GOBBETTI, M.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; DI CAGNO, R. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1-3, p. 57-69, 2005. doi:10.1016/j.tifs.2004.02.013

GOBBETTI, M.; RIZZELLO, C. G.; DI CAGNO, R.; DE ANGELIS, M. How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. **Food Microbiology**, v. 37, p. 30-40, Feb 2014. doi:10.1016/j.fm.2013.04.012

GOESAERT, H.; LEMAN, P.; BIJTTEBIER, A.; DELCOUR, J. A. Antifirming effects of starch degrading enzymes in bread crumb. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 2346-2355, 2009.

GRAY, J. A.; BEMILLER, J. N. Bread staling: Molecular basis and control. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 1, p. 1-21, 2003. doi:10.1111/j.1541-4337.2003.tb00011.x

GROSCH, W. Lipid degradation products and flavors. In: In: MORTON, I. D. e MACLEOD, A. J. (Ed.). **Food Flavors. Part A. Introduction** Amsterdam: Elsevier, v.first, 1982. p.325-385.

GUERZONI, M. E.; VERNOCCHI, P.; NDAGIJIMANA, M.; GIANOTTI, A.; LANCIOTTI, R. Generation of aroma compounds in sourdough: effects of stress exposure and *lactobacilli*-yeasts interactions. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 139-48, Apr 2007. doi:10.1016/j.fm.2006.07.007

GUERZONI, M. E.; SERRAZANETTI, D. I.; VERNOCCHI, P.; GIANOTTI, A. Physiology and biochemistry of sourdough yeasts. In: GOBBETTI, M. e GÄNZLE, M. (Ed.). **Handbook on Sourdough Biotechnology**. New York, USA: Springer, 2013. p.155-181.

GUINEE, T. P.; PUDIA, P. D.; FARKYE, N. Y. Fresh acid-curd cheese varieties. In: (Ed.). **Cheese Chemistry, Physics and Microbiology**. London:: Chapman & Hall, v.2, 1999. p.363-419.

GUINET, R.; GODON, B. **La Panification Française**. Barcelona, España: Ed. Montagud, 1996.

HADIYNTU, H.; ASSELMAN, A.; VAN STRATEN, G.; BOOM, R. M.; ESVELD, D. C.; VAN BOXTEL, A. J. B. Quality prediction of bakery products in the initial phase of process design. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, p. 285–298, 2007.

HAGER, A.-S.; ARENDT, E. K. Influence of hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), xanthan gum and their combination on loaf specific volume, crumb hardness and crumb grain characteristics of gluten-free breads based on rice, maize, teff and buckwheat. **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p. 195-203, 2013. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.12.021

HAMMES, W. P.; GÄNZLE, M. G. Sourdough bread and related products. In: WOOD, B. J. B. (Ed.). **Microbiology of Fermented Foods** London: Blackie Academic & Professional, v.1, 1998. p.199-216.

HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD, B. J. B. e HOLZAPFEL, W. H. (Ed.). **The genera of lactic acid bacteria**. London: Blackie Academic and Professional,, 1995. p.19.

HANSEN, A.; HANSEN, B. Flavour of sourdough wheat bread crumb. **Z Lebensm Unters Forsch** v. 202, p. 244-249, 1996.

HANSEN, A.; SCHIEBERLE, P. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1-3, p. 85-94, 2005. doi:10.1016/j.tifs.2004.03.007

HARTH, H.; VAN KERREBROECK, S.; DE VUYST, L. Community dynamics and metabolite target analysis of spontaneous, backslopped barley sourdough fermentations under laboratory and bakery conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 228, p. 22-32, Jul 02 2016. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.011

HEINIÖ, R.-L.; KATINA, K.; WILHELMSON, A.; MYLLYMÄKI, O.; RAJAMÄKI, T.; LATVA-KALA, K.; LIUKKONEN, K.-H.; POUTANEN, K. Relationship between sensory perception and flavour-active volatile compounds of germinated, sourdough

fermented and native rye following the extrusion process. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, n. 5, p. 533-545, 2003. doi:10.1016/s0023-6438(03)00057-4

HOSENEY, C. **Principles of cereals science and technology**. USA: American Association of Cereal Chemists, 1994.

HUYS, G.; DANIEL, H.-M.; DE VUYST, L. Taxonomy and biodiversity of sourdough yeasts and lactic acid bacteria. In: GOBBETTI, M. e GÄNZLE, M. (Ed.). **Handbook on Sourdough Biotechnology**. New York: Springer, 2013. p.105-154.

IGLESIAS-PUIG, E.; MONEDERO, V.; HAROS, M. Bread with whole quinoa flour and bifidobacterial phytases increases dietary mineral intake and bioavailability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 71-77, 2015. doi:10.1016/j.lwt.2014.09.045

IZYDORCZYK, M. S.; DEXTER, J. E. Barley  $\beta$ -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products—a Review. **Food Research International**, v. 41, n. 9, p. 850-868, 2008. doi:10.1016/j.foodres.2008.04.001

JÄGERSTAD, M.; PIIRONEN, V.; WALKER, C.; ROS, G.; CARNOVALE, E.; HOLASOVA, M.; NAU, H. Increasing natural food folates through bioprocessing and biotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 6-7, p. 298-306, 2005. doi:10.1016/j.tifs.2005.03.005

JEKLE, M.; BECKER, T. Effects of Acidification, Sodium Chloride, and Moisture Levels on Wheat Dough: II. Modeling of Bread Texture and Staling Kinetics. **Food Biophysics**, v. 7, n. 3, p. 200-208, 2012. doi:10.1007/s11483-012-9258-z

KADDOUR, A. A.; MONDET, M.; CUQ, B. Description of Chemical Changes Implied During Bread Dough Mixing by FT-ATR Mid-Infrared Spectroscopy. **Cereal Chemistry Journal**, v. 85, n. 5, p. 673-678, 2008. doi:10.1094/cchem-85-5-0673

KADITZKY, S.; SEITTER, M.; HERTEL, C.; VOGEL, R. F. Performance of *Lactobacillus sanfranciscensis* TMW 1.392 and its levansucrase deletion mutant in wheat dough and comparison of their impact on bread quality. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 2, p. 433-442, 2007. doi:10.1007/s00217-007-0738-1



KAMINSKI, E.; PRZYBILSKI, R.; GRUCHALA, L. Thermal degradation of precursors and formation of flavour compounds during heating of cereal products. Part I. Changes of amino acids and sugars. **Food/ Nahrung** v. 25, p. 507-518, 1981.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 49, 1983.

KARILUOTO, S.; VAHTERISTO, L.; SALOVAARA, H.; KATINA, K.; LIUKKONEN, K.-H.; PIIRONEN, V. Effect of Baking Method and Fermentation on Folate Content of Rye and Wheat Breads. **Cereal Chemistry**, v. 81, n. 1, 2004.

KATINA, K.; MAINA, N. H.; JUVONEN, R.; FLANDER, L.; JOHANSSON, L.; VIRKKI, L.; TENKANEN, M.; LAITILA, A. In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. **Food Microbiology**, v. 26, n. 7, p. 734-43, Oct 2009. doi:10.1016/j.fm.2009.07.008

KATINA, K.; SAURI, M.; ALAKOMI, H. L.; MATTILA-SANDHOLM, T. Potential of Lactic Acid Bacteria to Inhibit Rope Spoilage in Wheat Sourdough Bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 38-45, 2002. doi:10.1006/fstl.2001.0808

KETABI, A.; SOLEIMANIAN-ZAD, S.; KADIVAR, M.; SHEIKH-ZEINODDIN, M. Production of microbial exopolysaccharides in the sourdough and its effects on the rheological properties of dough. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 948-951, 2008. doi:10.1016/j.foodres.2008.07.009

KIM, H.-J.; MORITA, N.; LEE, S.-H.; MOON, K.-D. Scanning electron microscopic observations of dough and bread supplemented with *Gastrodia elata* Blume powder. **Food Research International**, v. 36, n. 4, p. 387-397, 2003. doi:10.1016/s0963-9969(02)00231-4

KATINA, K.; SAURI, M.; ALAKOMI, H. L.; MATTILA-SANDHOLM, T. Potential of Lactic Acid Bacteria to Inhibit Rope Spoilage in Wheat Sourdough Bread. **LWT - Food Science and Technology**, v. 35, n. 1, p. 38-45, 2002. doi:10.1006/fstl.2001.0808

KORAKLI, M.; ROSSMANN, A.; GÄNZLE, G. M.; VOGEL, F. R. Sucrose Metabolism and Exopolysaccharide Production in Wheat and Rye Sourdoughs by *Lactobacillus sanfranciscensis*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, 2001.

KTENIOUDAKI, A.; ALVAREZ-JUBETE, L.; SMYTH, T. J.; KILCAWLEY, K.; RAI, D. K.; GALLAGHER, E. Application of bioprocessing techniques (sourdough fermentation and technological aids) for brewer's spent grain breads. **Food Research International**, v. 73, p. 107-116, 2015. doi:10.1016/j.foodres.2015.03.008

LACAZE, G.; WICK, M.; CAPPELLE, S. Emerging fermentation technologies: development of novel sourdoughs. **Food Microbiology**, v. 24, n. 2, p. 155-60, Apr 2007. doi:10.1016/j.fm.2006.07.015

LACUMIN, L.; CECCHINI, F.; MANZANO, M.; OSUALDINI, M.; BOSCOLO, D.; ORLIC, S.; COMI, G. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 128-35, Apr 2009. doi:10.1016/j.fm.2008.10.010

LATTANZI, A.; MINERVINI, F.; DI CAGNO, R.; DIVICCARO, A.; ANTONIELLI, L.; CARDINALI, G.; CAPPELLE, S.; DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional Italian sweet leavened baked goods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, n. 2-3, p. 71-9, May 15 2013. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.010

LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; EVIDENTE, A.; LAZZARONI, S.; CORSETTI, A.; GOBBETTI, M. Purification and Characterization of Novel Antifungal Compounds from the Sourdough *Lactobacillus plantarum* Strain 21B. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 4084-4090, 2000. doi:10.1128/aem.66.9.4084-4090.2000

LAZARIDOU, A.; DUTA, D.; PAPAGEORGIOU, M.; BELC, N.; BILIADERIS, C. G. Effects of hydrocolloids on dough rheology and bread quality parameters in gluten-free formulations. **Journal of Food Engineering**, v. 79, n. 3, p. 1033-1047, 2007. doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.03.032

LEENHARDT, F.; LEVRAT-VERNY, M.-A.; CHANLIAUD, E.; RÉMÉSY, C. Moderate decrease of pH by sourdough fermentation is sufficient to reduce phytate content of whole wheat flour through endogenous phytase activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, 2005.

LHOMME, E.; LATTANZI, A.; DOUSSET, X.; MINERVINI, F.; DE ANGELIS, M.; LACAZE, G.; ONNO, B.; GOBBETTI, M. Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of sixteen French traditional sourdoughs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 215, p. 161-70, Dec 23 2015. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.015

LILJEBERG, G. M. H.; LÄNNER, H. C.; BJÖRCK, M. E. I. Sourdough Fermentation or Addition of Organic Acids or Corresponding Salts to Bread Improves Nutritional Properties of Starch in Healthy Humans. **Human and Clinical Nutrition**, 1995.

LILJEBERG, H. G.; BJÖRCK, I. M. Delayed gastric emptying rate may explain improved glycaemia in healthy subjects to a starchy meal with added vinegar. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, p. 368–371, 1998.

LITOPOULOU-TZANETAKI, E. N.; TZANETAKIS, A.; VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI. Effect of the type of lactic starter on microbiological, chemical and sensory characteristics of Feta cheese. **Food Microbiology**, v. 10, p. 31-41, 1993.

LIU, T.; LI, Y.; CHEN, J.; SADIQ, F. A.; ZHANG, G.; LI, Y.; HE, G. Prevalence and diversity of lactic acid bacteria in Chinese traditional sourdough revealed by culture dependent and pyrosequencing approaches. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 91-97, 2016. doi:10.1016/j.lwt.2015.12.025

LIU, T.; LI, Y.; SADIQ, F. A.; YANG, H.; GU, J.; YUAN, L.; LEE, Y. K.; HE, G. Predominant yeasts in Chinese traditional sourdough and their influence on aroma formation in Chinese steamed bread. **Food Chemistry**, v. 242, p. 404-411, Mar 1 2018. doi:10.1016/j.foodchem.2017.09.081

LIU, X.; ZHOU, M.; JIAXIN, C.; LUO, Y.; YE, F.; JIAO, S.; HU, X.; ZHANG, J.; LÜ, X. Bacterial diversity in traditional sourdough from different regions in China. **Lwt**, v. 96, p. 251-259, 2018. doi:10.1016/j.lwt.2018.05.023

LÖNNER, C.; WELANDER, T.; MOLIN, N.; DOSTALEK, M. The microflora in a sour dough started spontaneously on typical Swedish rye meal. **Food Microbiology**, v. 3, p. 3-12, 1986.

LUU, S.; CRUZ-MORA, J.; SETLOW, B.; FEEHERRY, F. E.; DOONA, C. J.; SETLOW, P. The effects of heat activation on *Bacillus* spore germination, with nutrients or under high pressure, with or without various germination proteins.

**Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 8, p. 2927-38, Apr 2015.  
doi:10.1128/AEM.00193-15

MACHADO ALENCAR, N. M.; STEEL, C. J.; ALVIM, I. D.; DE MORAIS, E. C.; ANDRE BOLINI, H. M. Addition of quinoa and amaranth flour in gluten-free breads: Temporal profile and instrumental analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 2, p. 1011-1018, 2015. doi:10.1016/j.lwt.2015.02.029

MAGNUSSON, J.; SCHNURER, J. *Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 1-5, Jan 2001.  
doi:10.1128/AEM.67.1.1-5.2001

MAKHOUL, S.; ROMANO, A.; CAPOZZI, V.; SPANO, G.; APREA, E.; CAPPELLIN, L.; BENOZZI, E.; SCAMPICCHIO, M.; MÄRK, T. D.; GASPERI, F.; EL-NAKAT, H.; GUZZO, J.; BIASIOLI, F. Volatile Compound Production During the Bread-Making Process: Effect of Flour, Yeast and Their Interaction. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 9, p. 1925-1937, 2015. doi:10.1007/s11947-015-1549-1

MANINI, F.; BRASCA, M.; PLUMED-FERRER, C.; MORANDI, S.; ERBA, D.; CASIRAGHI, M. C. Study of the Chemical Changes and Evolution of Microbiota During Sourdoughlike Fermentation of Wheat Bran. **Cereal Chemistry Journal**, v. 91, n. 4, p. 342-349, 2014. doi:10.1094/cchem-09-13-0190-cesi

MANINI, F.; CASIRAGHI, M. C.; POUTANEN, K.; BRASCA, M.; ERBA, D.; PLUMED-FERRER, C. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 275-283, 2016.  
doi:10.1016/j.lwt.2015.10.045

MANTZOURANI, I.; PLESSAS, S.; ODATZIDOU, M.; ALEXOPOULOS, A.; GALANIS, A.; BEZIRTZOGLU, E.; BEKATOROU, A. Effect of a novel *Lactobacillus paracasei* starter on sourdough bread quality. **Food Chemistry**, v. 271, p. 259-265, Jan 15 2019. doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.183

MARIOTTI, M.; GAROFALO, C.; AQUILANTI, L.; OSIMANI, A.; FONGARO, L.; TAVOLETTI, S.; HAGER, A.-S.; CLEMENTI, F. Barley flour exploitation in sourdough bread-making: A technological, nutritional and sensory evaluation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 973-980, 2014.  
doi:10.1016/j.lwt.2014.06.052

MARKLINDER, I.; JOHANSSON, L.; HAGLUND, A.; NAGEL-HELD, B.; SEIBEL, W. Effects of flour from different barley varieties on barley sourdough bread. **Food Quality and Preference**, v. 7, p. 275-284, 1996.

MARTI, A.; TORRI, L.; CASIRAGHI, M. C.; FRANZETTI, L.; LIMBO, S.; MORANDIN, F.; QUAGLIA, L.; PAGANI, M. A. Wheat germ stabilization by heat-treatment or sourdough fermentation: Effects on dough rheology and bread properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 1100-1106, 2014. doi:10.1016/j.lwt.2014.06.039

MASTILOVIC, J.; POPOV, S.; PSODOROV, D. **Optimization of the composition and process parameters for white wheat liquid sour dough production.** Proceedings of International Congress: Third Croatian Congress of Cereal Technologists. Opatija, Croatia: 14-17 p. 2001.

MEDCALF, D. G. Wheat starch properties and their effect on bread baking quality. **Bakers Digest**, p. 48-52, 1968.

MENTEŞ, Ö.; ERCAN, R.; AKÇELİK, M. Inhibitor activities of two *Lactobacillus* strains, isolated from sourdough, against rope-forming *Bacillus* strains. **Food Control**, v. 18, n. 4, p. 359-363, 2007. doi:10.1016/j.foodcont.2005.10.020

MEROTH, C. B.; WALTER, J.; HERTEL, C.; BRANDT, M. J.; HAMMES, W. P. Monitoring the Bacterial Population Dynamics in Sourdough Fermentation Processes by Using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 475-482, 2003. doi:10.1128/aem.69.1.475-482.2003

MESSENS, W.; DE VUYST, L. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, 2002.

MESSENS, W.; NEYSENS, P.; VANSIELEGHEM, W.; VANDERHOEVEN, J.; DE VUYST, L. Modeling Growth and Bacteriocin Production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in Response to Temperature and pH Values Used for Sourdough Fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1431-1435, 2002. doi:10.1128/aem.68.3.1431-1435.2002

MINERVINI, F.; DE ANGELIS, M.; DI CAGNO, R.; GOBBETTI, M. Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 136-46, Feb 03 2014. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.021

MICHEL, E.; MONFORT, C.; DEFFRASNES, M.; GUEZENEC, S.; LHOMME, E.; BARRET, M.; SICARD, D.; DOUSSET, X.; ONNO, B. Characterization of relative abundance of lactic acid bacteria species in French organic sourdough by cultural, qPCR and MiSeq high-throughput sequencing methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 35-43, Dec 19 2016. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.034

MINERVINI, F.; DE ANGELIS, M.; DI CAGNO, R.; PINTO, D.; SIRAGUSA, S.; RIZZELLO, C. G.; GOBBETTI, M. Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I. **Food Microbiol**, v. 27, n. 7, p. 897-908, Oct 2010. doi:10.1016/j.fm.2010.05.021

MINERVINI, F.; LATTANZI, A.; DE ANGELIS, M.; CELANO, G.; GOBBETTI, M. House microbiotas as sources of lactic acid bacteria and yeasts in traditional Italian sourdoughs. **Food Microbiology**, v. 52, p. 66-76, Dec 2015. doi:10.1016/j.fm.2015.06.009

MOHAMMADI, M.; SADEGHNIA, N.; AZIZI, M.-H.; NEYESTANI, T.-R.; MORTAZAVIAN, A. M. Development of gluten-free flat bread using hydrocolloids: Xanthan and CMC. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 1812-1818, 2014. doi:10.1016/j.jiec.2013.08.035

MORONI, A. V.; BELLO, F. D.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Impact of sourdough on buckwheat flour, batter and bread: Biochemical, rheological and textural insights. **Journal of Cereal Science**, v. 54, n. 2, p. 195-202, 2011. doi:10.1016/j.jcs.2011.04.008

MOSLEHI-JENABIAN, S.; LINDEGAARD, P. L.; JESPERSEN, L. Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. **Nutrients**, v. 2, p. 449–473, 2010.

NAKAI, H.; BAUMANN, M. J.; PETERSEN, B. O.; WESTPHAL, Y.; SCHOLS, H.; DILOKPIMOL, A.; HACHEM, M. A.; LAHTINEN, S. J.; DUUS, J. O.; SVENSSON, B. The maltodextrin transport system and metabolism in *Lactobacillus acidophilus* NCFM and production of novel alpha-glucosides through reverse phosphorolysis by

maltose phosphorylase. **The FEBS Journal**, v. 276, n. 24, p. 7353-65, 2009  
doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07445.x

NAKAMURA, L. K. Taxonomic Relationship of Black-Pigmented *Bacillus subtilis* Strains and a Proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, n. 3, p. 295-300, 1989.

NEYSENS, P. Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 29-39, 2003. doi:10.1016/s0168-1605(03)00079-5

NEYSENS, P.; DE VUYST, L. Kinetics and modelling of sourdough lactic acid bacteria. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1-3, p. 95-103, 2005. doi:10.1016/j.tifs.2004.02.016

NIDERKORN, V.; MORGAVI, D. P.; ABOAB, B.; LEMAIRE, M.; BOUDRA, H. Cell wall component and mycotoxin moieties involved in the binding of fumonisin B1 and B2 by lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 3, p. 977-85, Mar 2009. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04065.x

NIONELLI, L.; CURRI, N.; CURIEL, J. A.; DI CAGNO, R.; PONTONIO, E.; CAVOSKI, I.; GOBBETTI, M.; RIZZELLO, C. G. Exploitation of Albanian wheat cultivars: characterization of the flours and lactic acid bacteria microbiota, and selection of starters for sourdough fermentation. **Food Microbiology**, v. 44, p. 96-107, Dec 2014. doi:10.1016/j.fm.2014.05.011

OSBORNE, T. B. **The protein of the wheat kernel**. Washington: Carnegie Institute of Washington, 1907.

OSSEYI, S. E.; WEHLING, L. R.; ALBRECHT, A. J. HPLC Determination of Stability and Distribution of Added Folic Acid and Some Endogenous Folates During Breadmaking. **Cereal Chemistry**, v. 78, n. 4, 2001.

ÖSTMAN, E. **Fermentation as a means of optimizing the glycaemic index e food mechanisms and metabolic merits with emphasis on lactic acid in cereal products**. 2003. (Ph.D). Department of Applied Nutrition and Food Chemistry, Lund University,



PARASKEVOPOULOU, A.; CHRYSANTHOU, A.; KOUTIDOU, M. Characterisation of volatile compounds of lupin protein isolate-enriched wheat flour bread. **Food Research International**, v. 48, p. 568–577, 2012.

PEJ CZ, E.; GIL, Z.; WOJCIECHOWICZ-BUDZISZ, A.; PÓŁTORAK, M.; ROMANOWSKA, A. Effect of technological process on the nutritional quality of naked barley enriched rye bread. **Journal of Cereal Science**, v. 65, p. 215-219, 2015. doi:10.1016/j.jcs.2015.07.015

PÉTEL, C.; ONNO, B.; PROST, C. Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 59, p. 105-123, 2017. doi:10.1016/j.tifs.2016.10.015

PETERSSON, S.; SCHNURER, J. Biocontrol of Mold Growth in High-Moisture Wheat Stored under Airtight Conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, 1995.

PLESSAS, S.; BEKATOROU, A.; GALLANAGH, J.; NIGAM, P.; KOUTINAS, A. A.; PSARIANOS, C. Evolution of aroma volatiles during storage of sourdough breads made by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* or *Lactobacillus helveticus*. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 883-889, 2008. doi:10.1016/j.foodchem.2007.09.010

PLESSAS, S.; FISHER, A.; KOURETA, K.; PSARIANOS, C.; NIGAM, P.; KOUTINAS, A. A. Application of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *L. helveticus* for sourdough bread making. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 985-990, 2008. doi:10.1016/j.foodchem.2007.07.012

PONTONIO, E.; NIONELLI, L.; CURIEL, J. A.; SADEGHI, A.; DI CAGNO, R.; GOBBETTI, M.; RIZZELLO, C. G. Iranian wheat flours from rural and industrial mills: Exploitation of the chemical and technology features, and selection of autochthonous sourdough starters for making breads. **Food Microbiology**, v. 47, p. 99-110, May 2015. doi:10.1016/j.fm.2014.10.011

POUTANEN, K.; FLANDER, L.; KATINA, K. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. **Food Microbiology**, v. 26, n. 7, p. 693-9, Oct 2009. doi:10.1016/j.fm.2009.07.011

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R. S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p. 400-407, 2003.

PURLIS, E.; SALVADORI, V. O. Modelling the browning of bread during baking. **Food Research International**, v. 42, p. 865–870, 2009.

QUÍLEZ, J.; RUIZ, J. A.; ROMERO, M. P. Relationships Between Sensory Flavor Evaluation and Volatile and Nonvolatile Compounds in Commercial Wheat Bread Type Baguette. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 6, p. S423-S427, 2006. doi:10.1111/j.1750-3841.2006.00053.x

RAVYTS, F.; DE VUYST, L. Prevalence and impact of single-strain starter cultures of lactic acid bacteria on metabolite formation in sourdough. **Food Microbiology**, v. 28, 2011.

REALE, A.; DI RENZO, T.; SUCCI, M.; TREMONTE, P.; COPPOLA, R.; SORRENTINO, E. Identification of lactobacilli isolated in traditional ripe wheat sourdoughs by using molecular methods. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 237-244, 2010. doi:10.1007/s11274-010-0448-x

REALE, A.; DI RENZO, T.; PREZIUSO, M.; PANFILI, G.; CIPRIANO, L.; MESSIA, M. C. Stabilization of sourdough starter by spray drying technique: New breadmaking perspective. **Lwt**, v. 99, p. 468-475, 2019. doi:10.1016/j.lwt.2018.10.016

RIEDER, A.; HOLTEKJØLEN, A. K.; SAHLSTRØM, S.; MOLDESTAD, A. Effect of barley and oat flour types and sourdoughs on dough rheology and bread quality of composite wheat bread. **Journal of Cereal Science**, v. 55, n. 1, p. 44-52, 2012. doi:10.1016/j.jcs.2011.10.003

RIPARI, V.; CECCHI, T.; BERARDI, E. Microbiological characterisation and volatiles profile of model, ex-novo, and traditional Italian white wheat sourdoughs. **Food Chemistry**, v. 205, p. 297-307, 2016. doi:10.1016/j.foodchem.2016.02.150

RIPARI, V.; GANZLE, M. G.; BERARDI, E. Evolution of sourdough microbiota in spontaneous sourdoughs started with different plant materials. **International Journal of Food Microbiology**, v. 232, p. 35-42, 2016. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.025

RIZZELLO, C. G.; CASSONE, A.; CODA, R.; GOBBETTI, M. Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. **Food Chemistry**, v. 127, n. 3, p. 952-9, 2011. doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.063

RIZZELLO, C. G.; CALASSO, M.; CAMPANELLA, D.; DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Use of sourdough fermentation and mixture of wheat, chickpea, lentil and bean flours for enhancing the nutritional, texture and sensory characteristics of white bread. **International Journal of Food Microbiology**, v. 180, p. 78-87, 2014. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.005

RIZZELLO, C. G.; LORUSSO, A.; MONTEMURRO, M.; GOBBETTI, M. Use of sourdough made with quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour and autochthonous selected lactic acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread. **Food Microbiology**, v. 56, p. 1-13, 2016. doi:10.1016/j.fm.2015.11.018

ROCHA, J. M.; MALCATA, F. X. Microbiological profile of maize and rye flours, and sourdough used for the manufacture of traditional Portuguese bread. **Food Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 72-88, 2012. doi:10.1016/j.fm.2012.01.008

ROCHA, M. J.; MALCATA, X. Microbial Ecology Dynamics in Portuguese Broa Sourdough. **Journal of Food Quality**, v. 339, 2016.

ROMANO A.; GANDOLFI R.; NITTI P.; ROLLINI M.; F., M. Acetic acid bacteria as enantioselective biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, n. 6, p. 235-240, 2002. doi:10.1016/S1381-1177(02)00013-9

ROSENKVIST, H.; HANSEN, A. Contamination profiles and characterisation of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p. 353-363, 1995.

SAHLSTROM, S.; PARK, W.; SHELTON, D. R. Factors influencing yeast fermentation and the effect of LMW sugars and yeast fermentation on hearth bread quality. **Cereal Chemistry**, v. 81, p. 328-335, 2004.

SALOVAARA, H.; VALJAKKA, T. The effect of fermentation temperature, flour type, and starter on the properties of sour wheat bread. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 22, n. 6, p. 591-597, 1987.

SCHEIRLINCK, I.; VAN DER MEULEN, R.; VAN SCHOOR, A.; VANCANNEYT, M.; DE VUYST, L.; VANDAMME, P.; HUYS, G. Taxonomic structure and stability of the bacterial community in belgian sourdough ecosystems as assessed by culture and population fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 2414-23, Apr 2008. doi:10.1128/AEM.02771-07

SCHULZ, A. Der Einfluss organischer Säuren auf die Vergärung verschiedener. **Z. Getr Mehl Brot**, v. 26, p. 129-133, 1972.

SCHNÜRER, J.; MAGNUSSON, J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 1-3, p. 70-78, 2005. doi:10.1016/j.tifs.2004.02.014

SCHWAB, C.; MASTRANGELO, M.; CORSETTI, A.; GÄNZLE, M. Formation of Oligosaccharides and Polysaccharides by *Lactobacillus reuteri* LTH5448 and *Weissella cibaria* 10M in Sorghum Sourdoughs. **Cereal Chemistry Journal**, v. 85, n. 5, p. 679-684, 2008. doi:10.1094/cchem-85-5-0679

SEITZ, L. M.; CHUNG, O. K.; RENGARAJAN, R. Volatiles in selected commercial bread. **Cereal Chemistry Journal**, v. 75, p. 847-853, 1998.

SETLOW, P. I will survive: Protecting and Repairing Spore DNA. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 9, p. 2737-2741, 1992.

\_\_\_\_\_. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 514-25, Sep 2006. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02736.x

SHITTU, T. A.; AMINU, R. A.; ABULUDE, E. O. Functional effects of xanthan gum on composite cassava-wheat dough and bread. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 8, p. 2254-2260, 2009. doi:10.1016/j.foodhyd.2009.05.016

SIEPMANN, F. B.; RIPARI, V.; WASZCZYNSKYJ, N.; SPIER, M. R. Overview of Sourdough Technology: from Production to Marketing. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 2, p. 242-270, 2018. doi:10.1007/s11947-017-1968-2

SINGH, K. V.; DEVI, A.; PATHANIA, S.; KUMAR, V.; TRIPATHI, K. D.; SHARMA, S.; CHAUHAN, K. D.; SINGH, K. V.; ZORBA, V. Spectroscopic investigation of wheat grains (*Triticum aestivum*) infected by wheat seed gall nematodes (*Anguina tritici*). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 58-66, 2017.

SIRAGUSA, S.; DI CAGNO, R.; ERCOLINI, D.; MINERVINI, F.; GOBBETTI, M.; DE ANGELIS, M. Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* starters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 1099-109, 2009. doi:10.1128/AEM.01524-08

SLUKOVÁ, M.; HINKOVÁ, A.; HENKE, S.; SMRŽ, F.; LUKAČÍKOVÁ, M.; POUR, V.; BUBNÍK, Z. Cheese whey treated by membrane separation as a valuable ingredient for barley sourdough preparation. **Journal of Food Engineering**, v. 172, p. 38-47, 2016. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.03.023

SOROKULOVA, I. B.; REVA, O. N.; SMIRNOV, V. V.; PINCHUK, I. V.; LAPA, S. V.; URDACI, M. C. Genetic diversity and involvement in bread spoilage of *Bacillus* strains isolated from flour and rony bread. **Letters in Applied Microbiology** 2, v. 37, p. 169-173, 2003.

SPICHER, G. Baked goods. In: H. J. REHM e REED, G. (Ed.). **Biotechnology**. Weinheim, Germany: Verlag Chemie, 1983. p.1-80.

SPICHER, G.; STEPHAN, H. **Handbuch Sauerteig, Biologie-Biochemie-Technologie**. 1993.

SPICHER, G.; STEPHAN, H. **Handbuch Sauerteig: Biologie, Biochemie, Technologie**. Germany: Behr's Verlag, 1999.

STERR, Y.; WEISS, A.; SCHMIDT, H. Evaluation of lactic acid bacteria for sourdough fermentation of amaranth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 1, p. 75-82, 2009. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.006

STOKIĆ, E.; MANDIĆ, A.; SAKAČ, M.; MIŠAN, A.; PESTORIĆ, M.; ŠIMURINA, O.; JAMBREC, D.; JOVANOVIĆ, P.; NEDELJKOVIĆ, N.; MILOVANOVIĆ, I.; SEDEJ, I. Quality of buckwheat-enriched wheat bread and its antihyperlipidemic effect in statin treated patients. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 556-561, 2015. doi:10.1016/j.lwt.2015.03.023

STOLZ, P.; BOCKER, G.; VOGEL, R. F.; HAMMES, W. P. Utilisation of maltose and glucose by lactobacilli isolated from sourdough. **FEMS Microbiology Letters**, v. 109, p. 237-243, 1993.

STOLZ, P.; BÖCKER, G.; VOGEL, R. F.; HAMMES, W. P. Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough II *Lactobacillus pontis*, *L. reuteri*, *L. amylovorus* and *L. fermentum*. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v. 201, p. 402-410, 1995.

STRUYF, N.; VERSPREET, J.; COURTIN, M. C. The effect of amylolytic activity and substrate availability on sugar release in non-yeasted dough. **Journal of Cereal Science**, v. 69, 2016. doi:10.1016/j.jcs.2016.02.016

SU, M. S.; OH, P. L.; WALTER, J.; GANZLE, M. G. Intestinal origin of sourdough *Lactobacillus reuteri* isolates as revealed by phylogenetic, genetic, and physiological analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6777-80, Sep 2012. doi:10.1128/AEM.01678-12

SULLIVAN, P.; ARENDT, E.; GALLAGHER, E. The increasing use of barley and barley by-products in the production of healthier baked goods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 29, n. 2, p. 124-134, 2013. doi:10.1016/j.tifs.2012.10.005

SWIECA, M.; SECZYK, L.; GAWLIK-DZIKI, U.; DZIKI, D. Bread enriched with quinoa leaves - the influence of protein-phenolics interactions on the nutritional and antioxidant quality. **Food Chemistry**, v. 162, p. 54-62, Nov 01 2014. doi:10.1016/j.foodchem.2014.04.044

SWIEGERS, J. H. B., P.A., PRETORIUS, I.S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. **Australian journal grape wine and research**, v. 11, p. 139-173, 2005.

TAKEDA, K.; MATSUMURA, Y.; SHIMIZU, M. Emulsifying and Surface Properties of Wheat Gluten under Acidic Conditions. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 3, 2001.

THIELE, C.; GÄNZLE, M. G.; VOGEL, R. F. Contribution of Sourdough *Lactobacilli*, Yeast, and Cereal Enzymes to the Generation of Amino Acids in Dough Relevant for

Bread Flavor. **Cereal Chemistry**, v. 79, n. 1, p. 45-51, 2002. doi:10.1094/cchem.2002.79.1.45

THOMPSON, J. M.; DODD, C. E. R.; WAITES, W. M. Spoilage of Bread by *Bacillus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 32, p. 55-66, 1993.

TIEKING, M.; GÄNZLE, M. G. Exopolysaccharides from cereal-associated lactobacilli. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 79-84, 2005.

VALERIO, F.; DE BELLIS, P.; LONIGRO, S. L.; VISCONTI, A.; LAVERMICOCCA, P. Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread-making to prevent *Bacillus subtilis* ropy spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, n. 3, p. 328-32, Mar 20 2008. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.005

VALERIO, F.; DI BIASE, M.; HUCHET, V.; DESRIAC, N.; LONIGRO, S. L.; LAVERMICOCCA, P.; SOHIER, D.; POSTOLLEC, F. Comparison of three *Bacillus amyloliquefaciens* strains growth behaviour and evaluation of the spoilage risk during bread shelf-life. **Food Microbiology**, v. 45, n. Pt A, p. 2-9, Feb 2015. doi:10.1016/j.fm.2014.07.006

VALMORRI, S.; TOFALO, R.; SETTANNI, L.; CORSETTI, A.; SUZZI, G. Yeast microbiota associated with spontaneous sourdough fermentations in the production of traditional wheat sourdough breads of the Abruzzo region (Italy). **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 97, n. 2, p. 119-29, Feb 2010. doi:10.1007/s10482-009-9392-x

VAN KERREBROECK, S.; BASTOS, F. C.; HARTH, H.; DE VUYST, L. A low pH does not determine the community dynamics of spontaneously developed backslopped liquid wheat sourdoughs but does influence their metabolite kinetics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 54-64, Dec 19 2016. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.019

VELASCO, I.; TENREIRO, S.; CALDERON, I. L.; ANDRÉ, B. *Saccharomyces cerevisiae* Aqr1 is an internal-membrane transporter involved in excretion of amino acids. **Eukaryot Cell** v. 3, p. 1492–1503, 2004.

VENTIMIGLIA, G.; ALFONZO, A.; GALLUZZO, P.; CORONA, O.; FRANCESCA, N.; CARACAPPA, S.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. **Food Microbiology**, v. 51, p. 57-68, Oct 2015. doi:10.1016/j.fm.2015.04.011



VERA, A.; LY-CHATAIN, M. H.; RIGOBELLO, V.; DEMARIGNY, Y. Description of a French natural wheat sourdough over 10 consecutive days focussing on the lactobacilli present in the microbiota. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 2, p. 369-77, Feb 2012. doi:10.1007/s10482-011-9642-6

VERNON-CARTER, E. J.; GARCIA-DIAZ, S.; REYES, I.; CARRILLO-NAVAS, H.; ALVAREZ-RAMIREZ, J. Rheological and thermal properties of dough and textural and microstructural characteristics of bread with pulque as leavening agent. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, 2017. doi:10.1016/j.ijgfs.2017.03.001

VON HOLY, A.; ALLAN, C. Current perspectives on rope in bread. In: SMITH, M. F.; KORT, M. J., *et al* (Ed.). **Proceedings of the Second National Bakery Symposium**. Durban: Technikon Natal Printers., 1990. p.119-125.

YAN, B.; SADIQ, F. A.; CAI, Y.; FAN, D.; CHEN, W.; ZHANG, H.; ZHAO, J. Microbial diversity in traditional type I sourdough and jiaozi and its influence on volatiles in Chinese steamed bread. **Lwt- Food Science and Technology**, v. 101, p. 764-773, 2019. doi:10.1016/j.lwt.2018.12.004

WANG, C. Y.; WU, S. J.; SHYU, Y. T. Antioxidant properties of certain cereals as affected by food-grade bacteria fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 4, p. 449-56, Apr 2014. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.10.002

WOLTER, A.; HAGER, A. S.; ZANNINI, E.; GALLE, S.; GANZLE, M. G.; WATERS, D. M.; ARENDT, E. K. Evaluation of exopolysaccharide producing *Weissella cibaria* MG1 strain for the production of sourdough from various flours. **Food Microbiology**, v. 37, p. 44-50, Feb 2014. doi:10.1016/j.fm.2013.06.009

ZANNINI, E.; GAROFALO, C.; AQUILANTI, L.; SANTARELLI, S.; SILVESTRI, G.; CLEMENTI, F. Microbiological and technological characterization of sourdoughs destined for bread-making with barley flour. **Food Microbiology**, v. 26, n. 7, p. 744-53, Oct 2009. doi:10.1016/j.fm.2009.07.014

ZHANG, C.; BRANDT, M.; SCHWAB, C.; GÄNZLE, M. Propionic acid production by cofermentation of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus diolivorans* in sourdough. **Food Microbiology**, 2010. doi:10.1016/j.fm.2009.11.019

YAN, B.; SADIQ, F. A.; CAI, Y.; FAN, D.; CHEN, W.; ZHANG, H.; ZHAO, J. Microbial diversity in traditional type I sourdough and jiaozi and its influence on volatiles in Chinese steamed bread. **Lwt -Food Science and Technology**, v. 101, p. 764-773, 2019. doi:10.1016/j.lwt.2018.12.004

YU, Y.; WANG, L.; QIAN, H.; ZHANG, H.; QI, X. Contribution of spontaneously-fermented sourdoughs with pear and navel orange for the bread-making. **Lwt- Food Science and Technology**, v. 89, p. 336-343, 2018. doi:10.1016/j.lwt.2017.11.001

## APÊNDICE A - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO EM FARINHAS DE TRIGO E TRIGO

Com o objetivo de identificar as bactérias ácido lácticas (BALs) presentes nas farinhas de trigo comercializadas no Brasil, foi realizado o isolamento em 8 farinhas de trigo e dois grãos de trigo adquiridas em diferentes regiões, conforme apresentado na Tabela 1.

TABELA 1: LOCALIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS PARA O ISOLAMENTO DAS BALS

Amostra	Classificação	Marca	Região
1	Farinha de Trigo Branca	A	Sul do Brasil
2	Farinha de Trigo Branca	B	Sul do Brasil
3	Farinha de Trigo Branca	C	Sul do Brasil
4	Farinha de Trigo Branca	D	Sul do Brasil
5	Farinha de Trigo Branca	E	Sudeste do Brasil
6	Farinha de Trigo Branca	F	Centro-Oeste do Brasil
7	Farinha de Trigo Integral	G	Sul do Brasil
8	Farinha de Trigo Integral	D	Sul do Brasil
9	Grão de trigo	-	Brasil
10	Grão de trigo	-	Uruguai

Para o isolamento dez gramas de cada amostra foram homogeneizados com 90 mL de água peptonada estéril em (1% [p/v] de peptona e 0,9% [p/v] de NaCl). As amostras foram diluídas até  $10^{-3}$  e plaqueadas 0,1 ml em três meios diferentes, Elliker (Himedia, Índia), Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Himedia, Índia) e Sourdough Bacteria (SDB) (Kline e Sugihara, 1971), com sobrecamada do mesmo meio e incubado a 35 °C por 48 h. Para cada meio (Elliker, MRS e SDB) e amostra, foram selecionadas aleatoriamente pelo menos 20 colônias. As colônias isoladas foram analisadas quanto a coloração de Gram (Pelczar et al., 1996), catalase e produção de CO<sub>2</sub>. As bactérias com formato de bastonetes e cocos, Gram-positivo, catalase negativos, sem motilidade, e produtores ou não de CO<sub>2</sub>, foram cultivadas por 24h a 35 °C no mesmo meio em que foram isoladas e em seguida armazenadas a -20 °C em 20% (v / v) de glicerol. A identificação das espécies foi realizada pelo Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) utilizando a técnica Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight (MALDI-TOF). As culturas foram codificadas segundo a Tabela 1 e depositadas na Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde (FIOCRUZ / CBAS).

No total foram encaminhadas 20 cepas para a identificação, os resultados obtidos encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2-** Identificação das bactérias ácido lácticas isoladas da farinha de trigo branca, integral comercializadas no Brasil e em grão de trigo

Cepa	Amostra de isolamento	BAL identificada	% Similaridade Genbank	Sequência tamanho (bp)	Meio de Cultura de Isolamento
1	1- Farinha de	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.67 (AJ305321)	1519	SDB
2	Trigo Branca	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.76 (AJ305321)	1519	MRS
3	2- Farinha de	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.74 (AJ305321)	1501	Elliker
4	Trigo Branca	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.80 (AJ305321)	1383	MRS
5	3- Farinha de	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.67 (AJ305321)	1497	Elliker
6	Trigo Branca	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100.00 (ACGZ01000098)	1493	MRS
7		<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.82 (ACGZ01000098)	1532	SDB
8	4- Farinha de Trigo Branca	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.74 (AJ305321)	1511	Elliker
9	5- Farinha de Trigo Branca	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.80 (AJ305321)	1517	SDB
10		<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.93 (ACGZ01000098)	1501	MRS
11		<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.80 (ACGZ01000098)	1532	Elliker
12	6- Farinha de Trigo Branca	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.80 (AJ305321)	1547	MRS
13		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.73 (AJ305321)	1506	SDB
14	7- Farinha de Trigo Integral	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.80 (ACGZ01000098)	1517	MRS
15	8- Farinha de Trigo Integral	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.80 (AJ305321)	1511	MRS
16		<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.78 (ACGZ01000098)	1548	Elliker
17	9- Grão de trigo	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.93 (ACGZ01000098)	1504	MRS
18		<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.80 (AJ305321)	1541	MRS
19	10- Grão de trigo	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100.00 (ACGZ01000098)	1501	MRS
20		<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.80 (ACGZ01000098)	1504	Elliker

Entre as 20 colônias isoladas, foram identificadas duas espécies de BALs diferentes, *L. plantarum* e *P. pentosaceus* (Tabela 2). Com relação ao grão de trigo cultivado no Brasil (amostra 9), ambas BALs foram encontrados, explicando o isolamento dessas BALs nas amostras de farinha de trigo (3 e 5) e na farinha de trigo integral (amostra 8). Quanto às demais amostras (1, 2, 4, 7 e 10) apenas uma das BALs foi identificada, não havendo diferença entre os meios de cultura utilizados e a região de origem da amostra. Em *sourdough* produzido com diferentes espécies de trigo, *Triticum aestivum*, *Triticum durum* e sua mistura a *L. plantarum* foi encontrada apenas no *sourdough* com farinha de trigo de *T. aestivum* (Corsetti *et al.* 2001). Este resultado está de acordo com o encontrado neste trabalho, já que no Brasil não há produção ou comercialização em mercado regional de farinhas de *T. Durum*. As BALs *L. plantarum* e *P. pentosaceus* são comumente encontrados na farinha e em *sourdoughs* fermentados com diferentes substratos, como: trigo (Michel *et al.* 2016; Nionelli *et al.* 2014) e trigo com quinoa (Rizzello *et al.* 2016).

# APÊNDICE B- PERFIL VOLÁTIL DE SOURDOUGHS TIPO II FERMENTADO A 28 °C (A) E A 35 °C (B) COM DIFERENTES CULTURAS INICIADORAS

continua

Compostos Voláteis	R.T	1-A	1-B	2-A	2-B	3-A	3-B	4-A	4-B	5-A	5-B	6-A	6-B	7-A	7-B	8-A	8-B	9-A	9-B
<b>Alcoóis</b>																			
2,3-Butanediol. [R.(R*.R*)]-	3.81	14.37	nd	5.31	nd	3.63	nd	5.33	nd	1.58	nd	4.22	nd	6.21	0.52	2.16	nd	8.47	nd
1,3-Butanediol @	4.00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9.52	nd
Ethanol	4.306	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.20	nd	4.49	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1-Butanol	4.954	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.60	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1-Hexanol	6.16	2.60	10.16	6.28	8.73	1.33	5.14	5.85	6.27	1.23	10.62	3.78	11.12	0.54	9.82	3.90	12.71	6.28	7.54
Cycloheptanol	9.55	nd	1.54	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.56	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1-Heptanol	9.58	nd	nd	0.66	nd	nd	nd	1.69	nd	0.35	nd	nd	nd	nd	nd	0.46	nd	1.39	nd
1-Octen-3-ol	9.81	0.69	1.22	0.64	1.70	nd	nd	0.80	nd	0.60	2.80	3.37	nd	0.36	nd	2.79	2.42	nd	nd
2-Ethyl-1-hexanol	10.99	0.57	nd	nd	2.89	nd	1.84	2.10	nd	2.08	nd	nd	nd	0.31	nd	nd	nd	nd	nd
1-Hexanol. 2-ethyl-	10.99	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.54	nd	3.77	nd	nd	nd	3.58
2-propyl-1-pentanol	11.00	nd	0.72	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-Octen-1-ol (E)	11.84	nd	3.22	nd	3.73	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.10	nd	2.40	nd	nd	nd	3.49
Cyclooctyl alcohol	11.84	1.38	nd	2.37	nd	nd	2.25	nd	nd	9.03	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2-methoxy. Phenol	12.00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.93	nd	0.97	nd
3,4-Dimethylpent-2-ene-1-ol	12.34	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.72	nd
2-Nonen-1-ol, 2-methyl	12.35	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.60	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Phenylthyl alcohol	12.79	nd	nd	nd	0.59	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cyclohexanemethanol.	13.27	0.53	0.74	nd	1.58	nd	2.32	nd	0.99	nd	1.83	1.28	2.04	nd	2.31	nd	1.51	0.72	1.14
alpha...alpha..4-trimethyl-. trans	13.56	nd	nd	nd	2.40	nd	1.60	nd	nd	0.41	nd	nd	1.89	nd	nd	nd	0.63	nd	0.92
1-Decanol. 2-hexyl	13.56	nd	nd	nd	nd	nd	0.78	nd	2.16	nd	nd	nd	nd	0.16	nd	1.06	nd	nd	nd
2-Ethyl-1-dodecanol	13.73	nd	2.62	nd	4.57	nd	0.51	nd	nd	nd	nd	4.18	nd	nd	2.29	nd	1.48	nd	nd
1-Heptanol. 6-methyl	14.09	0.66	nd	nd	0.98	nd	1.37	nd	2.71	nd	0.33	0.42	nd	nd	0.72	0.35	nd	nd	nd
alpha. - Terpineol	13.33	0.42	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.50	nd	nd	nd
2,2-dimethyl -1-pentanol	14.95	nd	nd	nd	1.51	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1-Nonadecanol. TMS derivative	15.17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.95	nd	nd	0.56	nd	3.33	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1-Octadecanol. TMS derivative	15.73	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.36	nd	nd	nd	0.86
Tridecanol. 2-ethyl-2-methyl-	15.80	1.07	nd	nd	0.67	nd	nd	nd	0.40	0.56	nd	nd	nd	0.31	nd	nd	nd	nd	nd
1-Dodecanol	15.92	0.73	nd	nd	0.30	0.74	nd	nd	nd	nd	1.08	nd	nd	nd	0.57	nd	nd	nd	0.64
2-Isopropyl-5-methyl-1-heptanol	-	23.02	20.22	15.26	29.65	5.70	15.81	16.82	14.63	9.82	30.81	14.75	28.20	7.89	22.76	11.80	19.10	33.07	15.68
<b>Porcentagem de Área</b>																			
<b>Aldeídos</b>																			
Hexanal	4.00	nd	nd	5.68	nd	nd	nd	9.37	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	23.16	nd
2-Heptanal (Z)	9.00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.04	nd	nd	nd	1.10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzeneacetaldedehyde	11.33	nd	nd	nd	1.78	nd	0.90	nd	nd	nd	0.76	nd	4.13	nd	nd	nd	1.63	nd	1.38
2-Octenal (E)	11.62	2.07	nd	9.93	3.46	0.43	nd	8.97	2.76	0.20	0.63	6.46	3.72	0.23	nd	2.13	2.79	3.87	2.40
Nonanal	12.55	0.57	1.95	4.06	nd	2.24	1.20	4.14	nd	2.52	nd	3.84	nd	2.49	1.17	1.77	0.71	3.83	nd
2-Nonenal (E)	12.65	1.04	nd	1.26	nd	0.50	nd	1.93	nd	nd	1.26	nd	nd	0.24	nd	nd	nd	nd	nd
2,5 Dihydroxybenzaldehyde	12.72	nd	0.41	nd	1.24	nd	nd	nd	nd	nd	0.91	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Volatile Compounds		R.T	1-A	1-B	2-A	2-B	3-A	3-B	4-A	4-B	5-A	5-B	6-A	6-B	7-A	7-B	8-A	8-B	9-A	9-B
Decanal		14.30	0.33	0.82	nd	2.63	58	3.63	0.55	1.72	0.14	2.14	0.19	3.10	nd	3.91	0.43	1.52	0.48	2.01
2,4-Decadienal (E/E)		15.66	2.67	nd	6.96	nd	1.22	nd	5.52	nd	0.63	nd	4.55	nd	0.25	nd	1.44	nd	2.55	nd
4-Decenal. (E)-		15.96	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.19	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Porcentagem de Área		-	6.11	1.80	25.78	13.17	2.73	6.77	29.58	8.62	0.97	7.24	13.56	15.70	0.72	6.40	5.17	7.71	30.77	9.62
Ácidos Carboxílicos																				
Butanoic acid		3.73	42.29	12.61	34.70	nd	78.19	33.06	79.75	16.89	56.57	83.88	0.63	61.98	nd	13.73	nd			
Lactic Acid		6.77	nd	14.82	nd	23.59	nd	31.42	nd	19.53	nd	7.05	nd	11.68	nd	24.26	nd	12.83	nd	29.08
Hexanoic acid		9.88	nd	2.90	0.98	6.22	nd	5.43	0.78	4.13	nd	5.57	0.49	5.78	nd	6.66	1.11	3.75	0.52	4.58
Phosphono acetic Acid. 3TMS derivative		13.12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.80	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Nonanoic acid		13.71	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Dodecanedioic acid. 2TBDMS derivative		17.05	nd	nd	2.18	nd	nd	nd	nd	nd	0.49	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Porcentagem de Área		-	42.29	30.33	37.86	29.81	78.19	36.85	33.84	23.66	79.75	31.81	57.06	17.46	83.88	31.55	63.09	16.58	14.25	33.66
Ésteres																				
4-Ethylbenzoic acid. 2-ethoxyethyl ester		3.86	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.74	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Butanoic acid. ethyl ester		4.05	2.94	29.37	nd	nd	0.42	0.46	0.74	nd	0.79	9.02	nd	nd	0.37	0.64	nd	25.20	nd	nd
Acetic acid. butyl ester		4.38	3.78	10.87	nd	1.73	5.18	nd	1.05	nd	3.77	1.09+	nd	nd	4.32	1.77	nd	2.49	nd	2.97
Malonic acid. heptyl 2 – methyl/pent-3-yl ester		9.69	nd	nd	nd	nd	nd	0.69	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Formic acid. octyl ester		11.89	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.54	nd	nd	nd	1.61
Carbonic acid methyl tetradecyl ester		12.03	nd	nd	nd	0.98	nd	0.69	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Pentanoic acid. 2-methyl. 1-methylpropyl ester		12.44	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.08	nd	nd
Oxalic acid. 6-ethyloct-3-yl heptyl ester		12.49	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.47	nd	2.17	nd	2.70
10-Undecenoic acid, actyl ester		13.73	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.03	nd	0.70	nd
Docosanoic acid. docosyl ester		14.95	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.23	nd	0.13	nd	0.49	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sulfurous acid. hexyl octyl ester		15.17	nd	nd	nd	2.13	nd	1.41	nd	0.45	nd	nd	nd	1.49	nd	nd	nd	nd	nd	0.52
2-Propenoic acid. 2-methyl-. 3,3,5-trimethylcyclohexyl ester		16.46	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.17	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Diethyl Phthalate		19.63	nd	nd	nd	nd	nd	1.36	nd	0.71	nd	0.95	nd	nd	nd	1.82	nd	1.37	nd	nd
Porcentagem de Área		-	6.72	40.48	0.00	4.84	5.60	4.61	0.74	2.39	4.56	11.36	0.00	3.53	4.69	6.24	2.03	32.31	3.40	5.10
Alcanos																				
Heptane. 2,2,3,5-tetramethyl-		9.25	nd	0.19	nd	2.53	nd	2.22	0.92	0.94	nd	1.48	nd	3.68	nd	nd	nd	2.57	0.65	nd
1,3-Hexadinde, 3-ethyl-2-methyl		11.02	nd	nd	3.58	nd	nd	4.12	nd	0.58	nd	0.58	nd	2.81	nd	nd	1.12	nd	1.94	nd
Octane. 2,2,6-trimethyl-		9.80	nd	nd	nd	nd	nd	4.95	nd	6.44	nd	nd	nd	1.46	nd	5.84	nd	3.58	nd	5.24
Decane. 2,2,6-trimethyl-		10.83	1.76	nd	nd	nd	nd	1.06	1.25	nd	0.04	nd	0.80	1.14	nd	nd	nd	2.90	nd	nd
Hexane. 2,2,5 trimetyl		10.83	nd	1.09	nd	0.53	nd	nd	0.94	nd	0.91	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.53	nd
Undecane. 3,8-dimethyl-		11.58	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.10	nd	nd	nd	nd	2.31	nd
Nonane. 2-methyl-5-propyl		11.69	0.36	nd	nd	1.49	nd	nd	nd	nd	nd	0.67	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.70

Volatile Compounds		R.T	1-A	1-B	2-A	2-B	3-A	3-B	4-A	4-B	5-A	5-B	6-A	6-B	7-A	7-B	8-A	8-B	9-A	9-B	conclusão
Decane. 3.7-dimethyl-		12.47	0.90	nd	nd	0.71	nd	2.45	nd	3.42	0.32	0.14	nd	1.51	0.26	nd	0.54	1.31	2.07	nd	
Dodecane		14.16	0.96	nd	0.70	nd	0.21	1.08	nd	nd	0.13	nd	0.39	nd	0.08	1.34	0.61	nd	1.09	0.74	
Dodecane. 2.7.10-trimethyl-		14.17	nd	nd	0.78	nd	0.11	nd	nd	nd	nd	nd	0.23	nd	nd	1.95	3.42	0.70	0.77	nd	
Nonane. 5-(2-methylpropyl)-		14.17	2.72	0.30	nd	1.08	0.44	1.29	1.75	nd	0.51	1.06	0.45	1.78	0.44	nd	4.06	nd	1.70	nd	
Nonane. 3.7-dimethyl-		14.17	nd	nd	nd	1.03	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Heptadecane		14.25	0.53	nd	1.38	0.45	0.20	nd	nd	1.67	0.36	nd	nd	nd	nd	1.54	2.24	nd	2.37	2.75	
Hexadecane		14.24	0.63	nd	nd	nd	nd	nd	0.71	nd	0.21	nd	0.75	nd	0.23	nd	2.08	nd	nd	nd	
Undecane. 4.6 dimethyl		14.39	nd	nd	nd	0.88	nd	1.40	1.09	0.84	0.18	nd	nd	nd	0.12	0.93	0.86	nd	0.79	2.04	
Octane. 2-methyl-		14.73	nd	nd	0.81	nd	0.31	0.37	nd	nd	nd	0.50	1.76	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Nonadecane		14.94	2.00	nd	1.04	nd	nd	nd	nd	nd	0.11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Dodecane. 4.6-dimethyl-		15.41	1.34	1.09	7.38	nd	2.95	5.73	5.56	6.21	1.44	nd	2.01	2.62	0.83	5.06	1.25	1.03	2.85	6.94	
Nonane. 5-butyl-		15.41	nd	nd	nd	2.45	nd	0.66	nd	1.97	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Heneicosane		15.41	6.11	nd	nd	nd	1.27	0.71	1.67	0.81	0.28	nd	nd	3.25	0.22	nd	nd	nd	1.50	nd	
Cyclopentane. 1-pentyl-2-propyl-		15.79	nd	nd	nd	nd	0.23	0.93	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Heptadecane. 2.6.10.15-tetramethyl-		17.08	1.65	0.82	1.55	nd	0.15	nd	nd	3.04	nd	nd	0.98	0.32	0.29	1.01	nd	1.21	nd	0.31	
Tetradecane		17.08	0.63	nd	0.55	0.84	nd	3.56	0.11	1.65	0.30	nd	nd	0.75	nd	1.60	nd	nd	0.50	nd	
3-Ethyl-3-methylheptane		17.88	nd	nd	nd	nd	nd	0.42	nd	1.15	nd	1.38	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Octadecane		19.57	nd	0.26	nd	nd	nd	0.94	nd	nd	nd	0.65	0.10	nd	1.86	nd	nd	nd	nd	1.78	
Porcentagem de Área		-	18.96	3.75	17.85	14.60	6.42	27.77	17.07	29.08	4.37	6.79	12.34	19.61	2.47	19.27	16.18	13.30	16.76	23.81	
Cetonas																					
5-Hepten-2-one. 6-methyl-		10.01	nd	nd	nd	1.08	nd	nd	nd	nd	nd	1.15	nd	1.79	nd	1.32	nd	1.52	nd	1.34	
2(3H)-Furanone. dihydro-5-pentyl		16.69	2.22	1.01	2.14	1.54	0.89	1.29	0.70	2.15	0.53	2.30	1.32	1.84	0.35	1.78	1.14	1.95	1.17	1.72	
Porcentagem de Área		-	2.22	1.01	2.14	2.62	0.89	1.29	0.70	2.15	0.53	3.45	1.32	3.63	0.35	3.1	1.14	3.47	1.17	3.06	
Outros																					
2-Undecene. 6-methyl-. (Z)-		9.59	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.24	nd	2.53	nd	nd	nd	0.5	
1-Hexene. 3.5.5-trimethyl-		9.60	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.97	nd	nd	nd	1.07	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
Furan. 2-pentyl		10.10	0.68	1.19	1.11	1.22	0.47	1.72	1.25	2.43	nd	1.95	0.97	1.90	nd	1.17	0.59	3.31	0.58	1.15	
3-Heptene. 2.2.4.6.6-pentamethyl-		10.40	nd	nd	nd	nd	nd	1.79	nd	1.97	nd	1.21	nd	1.9	nd	1.86	nd	1.62	nd	0.99	
1.3-Hexadiene. 3-ethyl - 2-methyl		11.04	nd	1.22	nd	2.12	nd	1.84	nd	7.20	nd	4.02	nd	2.43	nd	3.32	nd	2.18	nd	1.22	
1-Octene. 2.6-dimethyl-		11.90	nd	nd	nd	1.97	nd	1.55	nd	4.85	nd	0.17	nd	4.33	nd	1.8	nd	0.42	nd	3.73	
Porcentagem de Área		-	0.68	2.41	1.11	5.31	0.47	6.90	1.25	18.42	7.35	0.97	11.87	10.68	0.59	7.53	0.58	7.59			
Culturas iniciadoras: (1) <i>Lactobacillus brevis</i> e <i>L. plantarum</i> ; (2) <i>L. brevis</i> . <i>L. plantarum</i> e <i>Pediococcus pentosaceus</i> ; (3) <i>L. brevis</i> . <i>L. plantarum</i> e <i>L. amilovor</i> ; (4) <i>L. brevis</i> . <i>L. plantarum</i> . <i>L. amilovor</i> e <i>P. pentosaceus</i> ; (5) <i>L. reuteri</i> e <i>L. plantarum</i> ; (6) <i>L. reuteri</i> . <i>L. plantarum</i> e <i>P. pentosaceus</i> ; (7) <i>L. reuteri</i> . <i>L. plantarum</i> e <i>L. amilovor</i> ; (8) <i>L. reuteri</i> . <i>L. plantarum</i> . <i>L. amilovor</i> e <i>P. pentosaceus</i> ; (9) <i>L. brevis</i> . <i>L. reuteri</i> . <i>L. plantarum</i> . <i>L. amilovor</i> e <i>P. pentosaceus</i>																					



# ANEXO A - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA FOOD AND BIOPROCESS TECHNOLOGY (QUALIS A1 PARA CIÊNCIA DE ALIMENTOS) REFERENTE AO ARTIGO 1 DESTE DOCUMENTO

Food Bioprocess Technol  
DOI 10.1007/s11947-017-1968-2



ORIGINAL PAPER

## Overview of Sourdough Technology: from Production to Marketing

Francieli B. Siepmann<sup>1</sup> · Valery Ripari<sup>2</sup> · Nina Waszczynskyj<sup>1</sup> · Michele R. Spier<sup>1</sup>

Received: 6 March 2017 / Accepted: 20 July 2017  
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

**Abstract** Sourdough is a type of dough fermented by yeast and lactic acid bacteria (LAB) used as sponge dough in bread making. Sourdough may have four classifications according to the fermentation type and the technological process used. On sourdough type I, the fermentation of yeasts and LAB present in the flour occurs spontaneously whereas in type II, fermentation occurs after the inoculation of a starter culture. Type III is simply type II sourdough dehydrated and type IV is a mixture of type I and type II sourdough, produced on laboratory scale. With LAB's growth during fermentation, pH decreases with subsequent hydrolysis of starch and protein, favoring the growth of yeasts. The yeast in turn, releases amino acids during autolysis, contributing to the growth of LAB. Due to this synergistic growth of LAB and yeasts, the prod-

**Keywords** Lactic acid bacteria · Yeast · Sourdough starter · Bakery products

### Introduction

Sourdough is defined as a dough of flour and water fermented by yeasts and lactic acid bacteria (LAB), used as a leavening agent for the production of bakery products (Chavan and Chavan 2011; Hammes and Gänzle 1998; Lönner et al. 1986). Usually it is used as rye or wheat flour, although other kinds of flour can be used for sourdough production and propagation, as flours of quinoa (Rizzello et al. 2016; Iglesias-Puig et al. 2015), semolinas (*Triticum durum*) (Alfonzo et al. 2016).

## ANEXO B - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY (QUALIS A2 PARA CIÊNCIA DE ALIMENTOS) REFERENTE AO ARTIGO 2 DESTE DOCUMENTO

European Food Research and Technology  
<https://doi.org/10.1007/s00217-019-03254-8>

ORIGINAL PAPER



### Brazilian sourdough: microbiological, structural, and technological evolution

Francieli Begnini Siepmann<sup>1</sup> · Beatriz Sousa de Almeida<sup>2</sup> · Valery Ripari<sup>3</sup> · Bruno J. G. da Silva<sup>4</sup> ·  
Patricio G. Peralta-Zamora<sup>4</sup> · Nina Waszczynskyj<sup>1</sup> · Michele Rigon Spier<sup>1</sup>

Received: 26 November 2018 / Revised: 9 January 2019 / Accepted: 9 February 2019  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

#### Abstract

This work aimed to evaluate the lactic acid bacteria (LAB) and yeast growth substrate consumption production of organic acids and volatile compounds in the Brazilian sourdough. In addition, the impact of fermentation on the structural modifications of the dough was also analyzed by Fourier-transform infrared spectroscopy and by Scanning electron microscope. Sourdough evaluations revealed that major biochemical changes occurred until the third day: highest LAB growth, increased acidity, production of alcohol and carboxylic acids, and modifications in the amides I and II of gluten and starch hydrolysis. Between the third–fifth days occurred the disappearance of butanoic acid and formation of different esters. As shown by principal component analysis, sourdough became mature after the fifth day, revealing stabilization of biochemical and technological parameters, besides the significant presence of esters and carboxylic acids. Therefore, this work acknowledges that the Brazilian traditional sourdough requires at least 5 days of fermentation to obtain the ideal technological qualities and volatile compounds for bakery applications.

## ANEXO C - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA LWT- FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY (QUALIS A1 PARA CIÊNCIA DE ALIMENTOS) REFERENTE AO ARTIGO 4 DESTE DOCUMENTO

---

### Accepted Manuscript

Influence of temperature and of starter culture on biochemical characteristics and the aromatic compounds evolution on type II sourdough and wheat bread

Francieli Begnini Siepmann, Beatriz Sousa de Almeida, Nina Waszczynskyj, Michele Rigon Spier



PII: S0023-6438(19)30260-9

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.065>

Reference: YFSTL 7963

To appear in: *LWT - Food Science and Technology*


Received Date: 1 February 2019

Revised Date: 14 March 2019

Accepted Date: 22 March 2019

Please cite this article as: Siepmann, F.B., Sousa de Almeida, B., Waszczynskyj, N., Spier, M.R., Influence of temperature and of starter culture on biochemical characteristics and the aromatic compounds evolution on type II sourdough and wheat bread, *LWT - Food Science and Technology* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.065>.

## ANEXO D - AUTORIZAÇÃO PARA REPUBLICAÇÃO DOS ARTIGOS NA FORMA DE TESE


<b>Confirmation Number: 11811760</b>
<b>Citation Information</b>
<b>Order Detail ID: 71889528</b> Food and bioprocess technology by SPRINGER-VERLAG NEW YORK INC. Reproduced with permission of SPRINGER-VERLAG NEW YORK INC in the format Thesis/Dissertation via Copyright Clearance Center.
<b>Order Detail ID: 71889544</b> LWT - Food Science and Technology : international journal for food chemistry, biochemistry, microbiology, technology and engineering ; publ. for the Swiss Soc. of Food Science and Technology by SCHWEIZERISCHE GESELLSCHAFT FUR LEBENSMITTEL-WISS Reproduced with permission of ACADEMIC PRESS in the format Thesis/Dissertation via Copyright Clearance Center.
<b>Order Detail ID: 71889552</b> European food research & technology by EuCheMS (Association).Division of Food Chemistry Reproduced with permission of SPRINGER-VERLAG BERLIN/HEIDELBERG in the format Thesis/Dissertation via Copyright Clearance Center.